



Universidade de Aveiro Departamento de Química

2016

**ANA RUTE SOARES
TEIXEIRA**

**REMOÇÃO SIMULTÂNEA DE
CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM
ÁGUAS SALINAS PELA MACROALGA
VIVA *ULVA LACTUCA***



Universidade de Aveiro Departamento de Química

2016

**ANA RUTE SOARES
TEIXEIRA**

**REMOÇÃO SIMULTÂNEA DE
CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM
ÁGUAS SALINAS PELA MACROALGA
VIVA *ULVA LACTUCA***

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre no Mestrado em Química, realizado sob a orientação científica da Doutora Eduarda Pereira, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, do Doutor Bruno Henriques, Bolseiro de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Engenheiro Carlos Vale, Investigador do CIIMAR do Porto.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais porque sem eles nada disto era possível.

O Júri

Presidente

Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Ricardo Prego Reboredo

Research Professor do Instituto de Investigadores Marinas do Spanish National Research Council

Prof.^a Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira

Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração de várias pessoas e instituições, às quais quero manifestar o meu agradecimento.

À Doutora Maria Eduarda Pereira e ao Engenheiro Carlos Vale, um especial agradecimento pelo seu empenho dedicação, disponibilidade e orientações recebidas.

Agradeço ao Doutor Bruno Henriques por toda a ajuda, dedicação e ensinamentos que me transmitiu. Um muito obrigado pela forma próxima como sempre me apoiou.

Obrigada também a todas as pessoas que conheci no meu percurso por Aveiro e que me ajudaram a aprender e a crescer.

Uma palavra de agradecimento aos meus pais, ao meu irmão, aos meus avós, à minha tia e ao meu namorado pela força e coragem transmitidas e sobretudo pelo apoio nos momentos mais difíceis.

A todos o meu muito OBRIGADO!

Palavras-chave

algas; bioacumulação; remoção de contaminantes inorgânicos; sistemas salinos; *Ulva lactuca*.

Resumo

Este trabalho pretende contribuir para o desenvolvimento de metodologias alternativas para o tratamento de águas contaminadas. Para isso, investigou-se a capacidade de bioabsorção/bioacumulação da macroalga viva, *Ulva lactuca*, em águas salina e salobra contendo uma mistura de contaminantes inorgânicos: As, Cd, Pb, Cu, Cr, Hg, Mn e Ni. Os resultados obtidos evidenciaram que esta macroalga tem uma elevada capacidade de biorremediação, e que variações de salinidade (15-35) não afetam a eficiência do processo. As maiores reduções nos níveis de contaminantes em solução foram obtidos para 6 g/L de alga, em peso fresco. A percentagem de remoção variou entre 98% para o Hg e 48% para o As. Globalmente, o modelo de *Elovich* foi o que melhor descreveu a cinética do processo. O recurso a extrações com soluções de EDTA (0.001, 0.01 e 0.1 M) permitiu esclarecer que a maioria do Hg (~98%) e Cr (~80%) atravessaram as paredes da macroalga e os restantes elementos estudados (Mn, Ni, Cd, Cu, As e Pb) estavam retidos à superfície (entre 60 e 80%). A boa correlação entre os metais e o Mn nos extractos sugere uma associação entre estes elementos e os óxidos de Mn presumivelmente formados à superfície da macroalga.

Keywords

algae; bioaccumulation; removal of inorganic contaminants; saline systems; *Ulva lactuca*.

Abstract

This work aims to contribute for the development of alternative methodologies of water remediation. For this, we investigated the biosorption/bioaccumulation capabilities of the living seaweed, *Ulva lactuca*, in salt and brackish waters, containing a mixture of inorganic contaminants: As, Cd, Pb, Cu, Cr, Hg, Mn and Ni. Results showed that the studied macroalga has a high bioremoval capacity, and that salinity variation (15-35) did not affect the efficiency of the process. The greatest reductions in the levels of contaminants in solution were obtained with 6 g/L of algae, in fresh weight. The removal percentages ranged from 48% for As to 98% for Hg. Overall, *Elovich* model was the best in describing the kinetics of the process. The use of extractions with EDTA (0.001, 0.01 to 0.1 M) has clarified that most of the Hg (~ 98%) and Cr (~ 80%) crossed the macroalgae walls, while the rest of the studied elements (Mn, Ni, cd, Cu, As and Pb) were retained at the surface (between 60 and 80%). The good correlation between metals and Mn in the extracts suggests an association between these elements and the oxides of Mn presumably formed on the surface of macroalgae.

Índice

1.	Introdução e contextualização do trabalho	1
1.1.	Contaminação de ecossistemas aquáticos	1
1.2.	Remoção de contaminantes de ecossistemas aquáticos	3
1.3.	Remoção de contaminantes de águas usando algas	7
1.4.	Avaliação da partição dos contaminantes inorgânicos nas algas.....	11
1.5.	Modelação matemática da cinética do processo de biorremoção	13
2.	Identificação dos objetivos do trabalho a realizar	15
3.	Materiais e métodos.....	17
3.1.	Materiais e reagentes	17
3.2.	Recolha da água do mar.....	17
3.3.	Recolha e manutenção da <i>Ulva lactuca</i>	17
3.4.	Ensaio de biorremoção das misturas de contaminantes inorgânicos.....	18
3.5.	Avaliação da partição dos contaminantes inorgânicos na macroalga.....	21
3.6.	Quantificação dos contaminantes inorgânicos em solução e na alga	21
3.6.1.	Quantificação de mercúrio em solução.....	21
3.6.2.	Quantificação dos restantes contaminantes inorgânicos em solução.....	22
3.6.3.	Quantificação de mercúrio na biomassa da <i>Ulva lactuca</i>	23
3.6.4.	Quantificação dos restantes contaminantes inorgânicos na biomassa da <i>Ulva lactuca</i>	24
3.7.	Avaliação dos resultados de biorremoção	24
3.7.1.	Modelação cinética dos dados de cinética de bioremoção	25
3.7.2.	Análise estatística dos dados.....	26
4.	Resultados e discussão	27
4.1.	Caracterização sumária das amostras de água do mar	27

4.2.	Caraterização sumária das amostras de alga.....	28
4.2.1.	Conteúdo de água	28
4.2.2.	Concentração dos elementos maioritários e minoritários.....	28
4.3.	Biorremocão de contaminantes pela macroalga <i>Ulva lactuca</i>	29
4.3.1.	Efeito da salinidade da água	29
4.3.2.	Efeito da massa de macroalga	31
4.4.	Avaliação da eficiência do processo de tratamento da água proposto	35
4.5.	Modelação cinética do processo de remoção de contaminantes com a macroalga... ..	39
4.6.	Concentração de contaminantes na macroalga.....	45
4.7.	Avaliação da fração de contaminante ligado extracelularmente	48
5.	Conclusão	55
6.	Bibliografia.....	57

Índice de Figuras

Figura 1.1: <i>Ulva lactuca</i> (em: [1]).....	10
Figura 4.1: Variação da concentração normalizada dos contaminantes inorgânicos em mistura ao longo do tempo, para duas salinidades (35 e 15). Valores apresentados correspondem à média de 3 réplicas, e as barras de erro representam o respectivo desvio padrão. Condições experimentais: 1,5 g, peso fresco de macroalga, por litro de solução; pH inicial=7,8.....	30
Figura 4.2: Variação das concentrações normalizadas dos contaminantes inorgânicos, ao longo do tempo, para as diferentes massas de alga (1,5, 3,0 e 6,0 g/L, peso fresco de macroalga por volume de solução). Valores apresentados correspondem à média de 3 réplicas e as barras de erro representam o desvio padrão; pH inicial=7,8.	33
Figura 4.3: Percentagens de remoção obtidas para os diferentes contaminantes inorgânicos, usando as massas de alga: 1,5, 3,0 e 6,0 g/L. Os valores apresentados correspondem à média de 3 réplicas.	36
Figura 4.4: Ajuste dos modelos cinéticos aos dados experimentais obtidos para os contaminantes estudados, com uma massa de alga de 1,5 g/L.....	40
Figura 4.5: Ajuste dos modelos cinéticos aos dados experimentais obtidos para os contaminantes estudados, com uma massa de alga de 3,0 g/L.....	40
Figura 4.6: Ajuste dos modelos cinéticos aos dados experimentais obtidos para os contaminantes estudados, com uma massa de alga de 6,0 g/L.....	41
Figura 4.7: Concentração de contaminante ($\mu\text{g/g}$) na biomassa da macroalga após contato com água salina contaminada, para as massas de macroalga de: A – 1,5 g/L; B – 3,0 g/L e C – 6,0 g/L. São apresentados os dados estimados e os obtidos experimentalmente (valores médios). Barras de erro correspondem ao desvio padrão de 3 réplicas no caso de qf teor e de 6 réplicas no caso de qf exp.....	46
Figura 4.8: Razão entre os valores de qf previsto e qf obtido, para os diferentes elementos e massas de alga de: A – 1,5 g/L, B – 3 g/L e C – 6 g/L (as razões são apresentadas a azul e a tracejado apresentam-se os valores dos desvios padrão).....	48
Figura 4.9: Percentagem de contaminante extracelular, de acordo com a quantificação dos extratos, após lavagem das algas com soluções de água ultrapura e EDTA com concentrações 0,001, 0,01 e 0,1 M. Dados correspondem a valores médios de 4 réplicas, sendo as barras de erro o desvio padrão.	49

Figura 4.10: Percentagem de contaminante extracelular, de acordo com a sua concentração na biomassa, após lavagem das algas com soluções de água ultrapura e EDTA com concentrações 0,001, 0,01 e 0,1 M. Dados correspondem a valores médios de 4 réplicas, sendo as barras de erro o desvio padrão..... 51

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Classificação de alguns elementos quanto ao grau de perigosidade de acordo com a Lista Prioritária de Substâncias Perigosas (Adaptado de ATSDR (2013). Os elementos mencionados na tabela correspondem aos que foram estudados neste trabalho..	2
Tabela 1.2: Principais métodos “convencionais” usados na remoção de contaminantes das águas residuais (adaptado de Farooq et al., 2010).....	4
Tabela 1.3: Principais grupos funcionais envolvidos no processo de biossorção (adaptado de Volesky, 2007)	6
Tabela 1.4: Resumo das condições utilizadas por alguns autores em estudos de extração com EDTA.	12
Tabela 1.5: Modelos cinéticos de reacção.....	13
Tabela 3.1: Concentrações de contaminantes inorgânicos utilizadas na preparação das soluções multielementares estudadas.	19
Tabela 4.1: pH, salinidade e condutividade da água do mar usada neste trabalho.	27
Tabela 4.2: Concentração de alguns elementos majoritários e minoritários na água do mar. Considerou-se como limite de quantificação o valor do padrão de concentração mais baixa.	27
Tabela 4.3: Concentração ($\mu\text{g/g}$) de elementos majoritários e minoritários na macroalga <i>Ulva lactuca</i> usada neste estudo.	28
Tabela 4.4: Resultados da modelação cinética, para massas de alga de 1,5, 3,0 e 6,0 g/L para os contaminantes estudados.....	42
Tabela 4.5: Concentrações de potássio ($\mu\text{g/L}$) nas soluções extratantes.	50
Tabela 4.6: Concentrações de potássio ($\mu\text{g/g}$) nas algas antes e após lavagem com água ultrapura, e com soluções de EDTA 0,001M, 0,01M e 0,1M.	51
Tabela 4.7: Correlação entre as concentrações dos contaminantes e a concentração de manganês, e de ferro nos extratos de EDTA (grau de confiança de 95%).....	53

1. Introdução e contextualização do trabalho

1.1. Contaminação de ecossistemas aquáticos

Ao longo das últimas décadas, o crescimento da população, a urbanização e a industrialização têm conduzido à degradação da qualidade da água e à diminuição da sua disponibilidade (Meenakshi & Maheshwari, 2006). Todos os anos, elevadas quantidades de compostos orgânicos e inorgânicos são lançadas para o ambiente como resultado das atividades humanas (Gavrilescu, 2004), como sejam descargas industriais, esgotos domésticos, escoamentos urbanos, fertilizantes, pesticidas e precipitação atmosférica (Akcali & Kucuksezgin, 2011; Flouty & Estephane, 2012).

Com o desenvolvimento e expansão de várias atividades humanas, nomeadamente, extração mineira, produção de combustíveis e de energia, uso de pesticidas e fertilizantes nos solos, metalurgia, galvanoplastia, eletrólise, tratamento do couro, fotografia, fabrico de eletrodomésticos, tintas, indústria de baterias e papel (Fu & Wang, 2011; Macek & Mackova, 2011; Wan Ngah & Hanafiah, 2008; Wang & Chen 2006; Williams et al., 1998), aumentou a descarga de efluentes com elevadas concentrações de elementos potencialmente tóxicos que são direta ou indiretamente lançados no ambiente (Wang & Chen, 2006).

Um grupo relevante de elementos potencialmente tóxicos presentes em água são o As, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Hg, Ni e Zn. Ao contrário de muitos contaminantes orgânicos, os metais e metaloides não são biodegradáveis e têm uma elevada persistência no ambiente, podendo acumular-se nos tecidos de diversos organismos. Deste modo, atingem-se concentrações mais elevadas ao longo da cadeia alimentar, podendo causar várias doenças (Flouty & Estephane, 2012; Fu & Wang, 2011; Wan Ngah & Hanafiah, 2008).

Vários organismos governamentais em todo o mundo, entre os quais se destacam a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, reconhecem os perigos que os metais representam para a saúde (Srivastava & Goyal, 2010). A Agência de Substâncias Tóxicas e Registo de Doenças dos Estados Unidos da América (ATSDR 2011) revê e publica periodicamente a “Lista Prioritária de Substâncias Perigosas”, de acordo com parâmetros como a toxicidade, a quantidade libertada e a facilidade de exposição. Na Tabela 1.1, são referenciados alguns dos elementos potencialmente perigosos e considerados prioritários, e é indicada a sua ordem de perigosidade para o ambiente.

Tabela 1.1: Classificação de alguns elementos quanto ao grau de perigosidade de acordo com a Lista Prioritária de Substâncias Perigosas (Adaptado de ATSDR (2013). Os elementos mencionados na tabela correspondem aos que foram estudados neste trabalho.

Classificação 2013	Elemento
1	Arsénio
2	Chumbo
3	Mercúrio
7	Cádmio
57	Níquel
78	Crómio
118	Cobre
139	Manganês

Cientes dos efeitos adversos da contaminação nos ecossistemas aquáticos e na saúde humana, e da necessidade de proteger os recursos hídricos, entidades reguladoras em todo o mundo têm estabelecido critérios de qualidade da água, publicados sob a forma de legislação. A nível europeu, a Diretiva 2000/60/CE selecionou as substâncias prioritárias que colocam em risco o ambiente aquático, propondo medidas específicas de combate e normas de qualidade ambiental aplicáveis a essas substâncias, que visam a sua redução progressiva. Um ano depois, esta diretiva foi aprovada através da Decisão n.º 2455/2001/CE. O Hg, o Cd e o Pb foram considerados “substâncias perigosas prioritárias” pela União Europeia, cujas descargas deveriam ser interrompidas ou progressivamente eliminadas no prazo de 20 anos. Por sua vez, o Ni foi apenas classificado como “substância prioritária”. Em 2008, surgiu a Diretiva final sobre Substâncias Prioritárias (Diretiva 2008/105/CE), onde se verifica a exclusão do Pb e dos seus compostos. No entanto, este metal continua a fazer parte da Lista II de substâncias que têm um efeito prejudicial sobre o ambiente aquático. Desta lista também fazem parte o Cu, o Ni, o Cr e o As (Diretiva 2006/11/CE). Recentemente, surgiu o Decreto-Lei n.º 103/2010 que transpõe a Diretiva 2008/105/CE e, parcialmente, a Diretiva 2009/90/CE, estabelecendo normas de qualidade ambiental (NQA) para as substâncias prioritárias e outros poluentes, a fim de assegurar a redução gradual da poluição.

1.2. Remoção de contaminantes de ecossistemas aquáticos

Os métodos atualmente denominados de “convencionais” mais usados na remoção de contaminantes de água são: precipitação, complexação química, filtração por membranas, métodos eletroquímicos, adsorção em carvão ativado, coagulação química, troca iônica, oxidação-redução e osmose reversa (Fu & Wang, 2011; Jalali et al., 2002; Reddad et al., 2002; Shukla et al., 2002). Contudo, estes processos podem ser ineficazes ou muito dispendiosos, sobretudo quando as concentrações dos contaminantes na solução se encontram em concentrações inferiores a 100 mg/L (Ahluwalia & Goyal, 2007; Jalali et al., 2002; Shukla et al., 2002). Outra desvantagem destes métodos é a formação de subprodutos químicos tóxicos cujo tratamento é muito caro (Ahluwalia & Goyal, 2007; Olette et al., 2008). Na Tabela 1.2 são dadas informações mais detalhadas sobre algumas características destes métodos “convencionais”.

A Tabela 1.2 permite dizer que a escolha mais adequada de um método depende da sua viabilidade econômica, ou seja, do volume de água a tratar, mas principalmente da eficiência requerida, isto é, da rapidez de remoção dos contaminantes que é necessária e da quantidade residual de contaminante admitida na solução obtida após tratamento.

Fu & Wang (2011) reviram recentemente os métodos que têm sido utilizados na remoção de metais das águas e as tecnologias incluem precipitação química, troca iônica, adsorção, filtração por membrana, coagulação-floculação, flotação e métodos eletroquímicos. Cerca de 185 estudos publicados entre 1988 e 2010 foram revistos, levando os autores a concluir que os métodos mais frequentemente estudados na remoção de metais das águas residuais são a troca iônica, a adsorção e a filtração por membrana.

Tendo em conta que os métodos tradicionais são muitas vezes pouco eficazes e envolvem custos elevados, houve a necessidade de encontrar alternativas mais eficientes, mais baratas e capazes de gerar menor quantidade de resíduos (Babel & Kurniawan, 2003; Walcarius & Mercier, 2010). Por exemplo, um dos processos mais atrativos na remoção de metais e/ou poluentes orgânicos devido à sua versatilidade, simplicidade e eficiência é a adsorção (Cobas et al., 2014; Lopes et al., 2014). Contudo, uma desvantagem é o alto custo dos adsorventes que são comercializados. Como tal, o objetivo de muitos estudos científicos tem sido a procura de materiais adsorventes alternativos, que sejam adequados mas de menor valor econômico (Cobas et al., 2014).

Tabela 1.2: Principais métodos “convencionais” usados na remoção de contaminantes das águas residuais (adaptado de Farooq et al. 2010).

Processo	Funcionamento	Vantagens	Desvantagens
Precipitação química	Os produtos químicos reagem com os metais formando precipitados insolúveis que podem ser separados da água por decantação ou filtração.	<ul style="list-style-type: none"> • Simples; • Baixo custo; • A maioria dos metais pode ser removida. 	<ul style="list-style-type: none"> • Produz uma grande quantidade de lamas; • Problemas de eliminação.
Coagulação química	Neutralização das forças que mantêm os metais em solução, levando à sua coagulação seguida de sedimentação ou filtração.	<ul style="list-style-type: none"> • Desidratação; • Estabilização de lamas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Custos elevados; • Grande consumo de químicos.
Troca iônica	As resinas de troca iônica têm a capacidade de trocar os seus cátions pelos cátions metálicos presentes nas águas.	<ul style="list-style-type: none"> • Alta regeneração de materiais; • Alta eficiência; • Seletividade de metais. 	<ul style="list-style-type: none"> • Custos elevados; • Menor número de íons metálicos removidos.
Métodos eletroquímicos	Galvanização da superfície de um cátodo pelos íons metálicos existentes na água.	<ul style="list-style-type: none"> • Seletividade de metais; • Não há consumo de químicos; • Conseguem-se metais puros. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto custo inicial; • Alto custo de execução; • pH da solução inicial e densidade da corrente.
Adsorção por carbono ativado	Grande área superficial, com poros, que adsorvem os metais.	<ul style="list-style-type: none"> • Maioria dos metais pode ser removida; • Elevada eficiência (>99%). 	<ul style="list-style-type: none"> • Custo do carbono ativado; • Não há regeneração; • A eficiência depende do adsorvente.
Processo de membrana e ultrafiltração	A ultrafiltração é um dos processos de membrana em que se utilizam baixas pressões para remover material coloidal e dissolvido. Outros processos de membrana usados são a osmose inversa, a nanofiltração e eletrodialise.	<ul style="list-style-type: none"> • Menor quantidade de resíduos sólidos produzidos; • Menor consumo de químicos; • Elevada eficiência (>95% para um único metal). 	<ul style="list-style-type: none"> • Custo inicial e de processo elevados; • Baixas taxas de fluxo; • A % de remoção é menor na presença de outros metais.

Neste contexto, a utilização como “adsorvente” de produtos naturais, largamente disponíveis, de materiais biológicos (ou derivados), e de resíduos ou co-resíduos de processos agroindustriais, emergiu recentemente como a alternativa econômica necessária, capaz de reduzir os níveis de contaminantes para valores ambientalmente aceitáveis (Kaduková & Virčíková, 2005). Alguns exemplos incluem: (i) produtos agrícolas, como arroz, palha, cascas de coco (Williams et al., 1998), casca de soja, casca de amendoim, casca de amêndoa, casca de algodão e sabugo de milho (Reddad et al., 2002); (ii) resíduos de processos de fermentação tais como *Aspergillus niger*, bagaço de nozes, resíduos de folhas de chá, serradura (Shukla et al., 2002) e resíduos do processamento de frutos do mar (Afkhami et al., 2010); (iii) biomassa de algas, musgos, fungos ou bactérias (Kratochvil & Volesky, 1998); (iv) sólidos inorgânicos, naturais ou sintéticos, como, argilas (Afkhami et

al., 2010), zeólitos e óxidos metálicos (Walcarius & Mercier, 2010) e (v) matéria orgânica natural, principalmente à base de polissacarídeos, tais como a quitosana, a celulose e o alginato (Walcarius & Mercier, 2010). Recentemente, foi também avaliado o uso de rolhas de cortiça e de casca de arroz como adsorventes para o tratamento de água (Ahmaruzzaman & Gupta 2011; Lopes et al., 2014; Rocha et al., 2013).


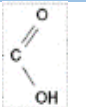

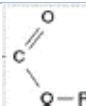
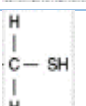
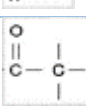
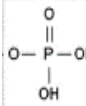
A biossorção e a bioacumulação são processos que têm suscitado crescente interesse, mostrando-se adequados no tratamento de águas contaminadas por metais (Chojnacka 2007; Kaduková & Virčíková, 2005; Farooq et al., 2010; Flouty & Estephane 2012; Mata et al., 2008). Os trabalhos de biossorção e/ou bioacumulação envolvem organismos, como plantas e macroalgas, e microrganismos como fungos, microalgas e bactérias (Macek & Mackova, 2011). Estes métodos são vantajosos porque apresentam baixo custo operacional, uma vez que são utilizados resíduos biológicos ou biomassa viva largamente disponíveis, e são muitas vezes altamente eficientes na remoção de contaminantes de águas. Geralmente o processo de remoção é rápido e ocorre sob condições de pressão e temperatura normais. A biossorção é um processo rápido (geralmente o equilíbrio é atingido em alguns minutos), passivo e independente da presença de nutrientes específicos, enquanto a bioacumulação é um processo mais lento, ativo e dependente de nutrientes (Flouty & Estephane, 2012; Kaduková & Virčíková, 2005). Estes métodos diferem ainda pelo facto de que na biossorção os contaminantes ficam ligados apenas à superfície das paredes celulares, enquanto na bioacumulação os contaminantes são biossorvidos na superfície e também acumulados no interior das células (Chojnacka, 2010).

A característica que proporciona elevada eficiência de remoção aos biossorventes é a existência, na sua parede celular, de vários grupos funcionais, com capacidade de se ligar aos contaminantes existentes em solução (Chojnacka 2010; Naja & Volesky 2009), dependendo esta ligação da concentração e do tipo de grupo presente na biomassa, da acessibilidade e da sua disponibilidade, assim como da afinidade entre o local e o metal (força da ligação) (Chojnacka, 2010; Vieira & Volesky, 2000). Na Tabela 1.3 apresentam-se as características de alguns destes grupos funcionais.

Embora não esteja totalmente clarificado, recentemente, Chojnacka (2010) defendeu que o principal mecanismo subjacente à biossorção é a troca iónica, onde os prótons competem com os cátions metálicos pelos locais de ligação. Por esta razão o pH é

um dos fatores que mais influencia o processo da biossorção. A diminuição do pH origina a protonação, o que permite regenerar os biossorbentes, por outro lado, o aumento do pH diminui a solubilidade dos complexos metálicos (Chojnacka, 2010). Outros fatores condicionadores da biossorção são o tipo de biomassa, a temperatura e a presença de iões competidores em solução (Chojnacka 2010; Mata et al., 2008).

Tabela 1.3: Principais grupos funcionais envolvidos no processo de biossorção (adaptado de Volesky 2007)

Grupo Funcional	Fórmula Estrutural	pKa	Átomo ligando	Classe de Compostos
Hidroxilo		9,5-13	O	Álcoois, Carbohidratos
Carboxilo		1,7-4,7	O	Ácidos gordos, proteínas, ácidos orgânicos
Amina		8-11	N	Proteínas, ácidos nucleicos
Éster		-	O	Lípidos
Tiol		8,3-10,8	S	Cisteína (aminoácido), proteínas
Carbonilo		-	O	Cetonas, polissacarídeos
Fosfato		6,1-6,8	O	DNA, RNA, ATP

O processo de bioacumulação também depende de vários fatores, tais como, a composição do meio, o pH, a temperatura, a presença de outros contaminantes, de agentes tensoativos, entre outros. (Chojnacka 2010; Kaduková & Virčíková, 2005). Um dos requisitos fundamentais deste processo é a presença de nutrientes nas águas, que possibilitem manter os sistemas vivos. Contudo esta desvantagem poderá ser minimizada através do uso de organismos fotossintéticos, como algas ou outras plantas aquáticas, que apenas necessitam de uma fonte de carbono inorgânico, como o CO₂, se o tempo dos ensaios for curto.

A utilização direta dos organismos vivos em detrimento da biossorção dispensa todos os processos inerentes à preparação da biomassa como a colheita, secagem,

processamento, ativação e armazenamento (Chojnacka, 2007; Malik, 2004). Além disso, num processo comum de biossorção, o biossorvente é transformado em pó (de modo a aumentar a área de contacto) e colocado em suspensão no efluente contaminado. Para além da necessidade de estar em constante agitação, o que é uma desvantagem pois a realização desta operação num efluente torna-se difícil ou dispendiosa (Henriques et al., 2015), este facto dificulta a separação do biossorvente da solução após tratamento, requerendo processos complexos de filtração. Na bioacumulação, a recolha de biomassa viva, sendo de maiores dimensões, torna-se mais simples.

Mudhoo et al. (2012) reviram a biossorção de metais, identificando vários tipos de biomassa microbiana extremamente eficazes na sua remoção. Os autores agruparam os novos tipos de biossorventes em: biomassa fúngica, biomassa inerte, algas marinhas castanhas secas, resíduos agrícolas, compósitos revestidos de quitosana, sorventes à base de celulose e estirpes bacterianas.

A publicação de He & Chen (2014) refere uma série de estudos que demonstram que a biossorção é uma tecnologia promissora para a remoção de metais a partir de soluções aquosas. As algas são destacadas como bons biossorventes devido à sua abundância no mar e em água doce, a uma boa relação custo-eficácia, à possibilidade de reutilização e à sua capacidade de sorção de metais.

1.3. Remoção de contaminantes de águas usando algas

As algas constituem uma matéria-prima de baixo custo e são muito abundantes nos oceanos, crescem rapidamente e têm uma elevada capacidade de sorção. Por estes motivos, elas têm suscitado o interesse da comunidade científica e estão na base de muitos estudos recentes que referem a sua utilidade na remoção de metais (Brinza et al., 2009; He & Chen, 2014; Jalali et al., 2002; Kaduková & Virčíková, 2005).

A capacidade de sorção de diferentes algas (duas verdes, duas castanhas e duas vermelhas) na remoção e recuperação de Cd, Ni, Zn, Cu e Pb a partir de soluções aquosas foi estudada, em 2007, por Romera et al.. Os melhores resultados foram obtidos para uma dose de biomassa mais baixa (0,5 g/L), e o pH identificado como adequado foi de 6 para o Cd, o Ni e o Zn e inferior a 5 para o Cu e o Pb. A eficiência de remoção dos metais pelas algas seguiu a ordem: $Pb > Cd \geq Cu > Zn > Ni$. As algas castanhas, *Fucus spiralis*,

revelaram a maior capacidade de remoção, permitindo atingir os níveis residuais mais baixos de metal em solução.

Em 2008, Mata et al. estudaram a remoção de Cd, Pb e Cu através da biomassa da alga castanha, *Fucus vesiculosus*. A sorção dos metais seguiu a sequência: $Cu > Cd \approx Pb$. Obteve-se uma sorção máxima de 0,963 mmol/g de Cd; 1,02 mmol/g de Pb e 1,66 mmol/g de Cu. No mesmo ano, Sari & Tuzen investigaram as características de bio-sorção de íons de Pb e de Cd, a partir de soluções aquosas utilizando biomassa da alga verde, *Ulva lactuca*. Foram estudados vários parâmetros, nomeadamente o pH, a quantidade de biomassa, o tempo de contacto e a temperatura. Com base nos resultados, concluiu-se que a *U. lactuca* é uma alternativa eficaz na remoção de íons Pb e Cd de águas residuais, pois apresenta uma elevada capacidade de bio-sorção e é um recurso natural, abundante, disponível e de baixo custo.

Areco et al. (2012) estudaram a bio-sorção de Cu, Cd, Pb e Zn, com o objetivo de aferir o potencial da *Ulva lactuca*, como bio-sorvente de metais e a sua possível utilização para o tratamento de efluentes industriais. Estudaram-se soluções binárias de Cd e Pb tendo-se verificado um decréscimo na taxa de sorção de ambos os metais quando ocorria a coadsorção.

Em 2014, a eficiência da biomassa de *Ulva lactuca* na remoção de Cd, a partir de soluções aquosas foi avaliada por Ghoneim et al. (2014). Verificou-se que o valor ótimo de pH foi 5,5 e que cerca de 0,1 g de *U. lactuca* foram suficientes para remover 99,2% de 10 mg/L de Cd, a 30°C, em soluções aquosas. Testes de des-sorção mostraram que o HCl foi o melhor para a eluição de metais a partir das algas testadas.

Em 2005, Kaduková & Virčíková estudaram as diferenças entre a bioacumulação e a bio-sorção de Cu pelas algas verdes, *Chlorella kessleri*, a partir de soluções sintéticas. Os autores concluíram que a capacidade de ligação das células vivas é menor do que a das células mortas, uma vez que o Cu danificou a superfície das células vivas, levando a uma perda parcial da sua capacidade de ligação e libertação do metal para a solução.

Flouty & Estephane (2012) avaliaram a remoção de íons Cu e Pb com algas *Chlamydomonas reinhardtii*, em sistemas monometálicos e em sistemas binários. As experiências foram realizadas em soluções que tinham 5×10^{-7} M de metais e 0,2 g/L de algas, à temperatura de 30°C e pH de 6. Nestas condições, as células mortas apresentaram maior eficiência de remoção dos íons metálicos do que as células vivas: a eficiência de

remoção do Pb aumentou de 8% para 40% quando se compararam os resultados obtidos com as células vivas com os das células mortas; no caso do Cu a eficiência de remoção das células mortas (55%) foi cerca de 2 vezes superior à das células vivas (28%).

Em 2011, Vasconcelos & Leal estudaram os efeitos antagônicos do Cd e do Pb na remoção de Cu pelas microalgas marinhas, *Emiliana huxleyi*, a partir de água do mar enriquecida com nitrato e fosfato. Verificou-se que os níveis celulares de Cu diminuíram ou não se alteraram, dependendo da idade das culturas, o que sugere que a sorção de Cu foi ligeiramente antagonizada pela presença de Pb. Observaram-se efeitos semelhantes para concentrações iniciais de chumbo de 310 pM, ou de cádmio de 120 pM e 400 pM, originando uma diminuição da taxa de crescimento da alga nos primeiros 7 dias.

Ibrahim (2011) estudou a eficiência de quatro espécies de algas vermelhas: *Corallina mediterranea*, *Galaxaura oblongata*, *Jania rubens* e *Pterocladia capilácea* na remoção de Co, Cd, Cr e Pb em efluentes industriais. Analisou vários parâmetros que afetam o processo de bio sorção, nomeadamente, o pH, o tempo de contacto e a quantidade de biomassa. A eficiência de bio sorção das algas na remoção de iões metálicos das águas residuais industriais foi avaliada em dois ciclos sucessivos. Observou-se que a eficiência de remoção de *C. mediterranea*, *G. oblongata*, *J. rubens*, e *P. capillacea* foi de 94% após dois ciclos de bio sorção-eluição, sendo a espécie *Galaxaura oblongata* a mais eficiente na remoção dos iões metálicos, com uma eficiência média de 84%. Este estudo demonstrou que as algas vermelhas constituem um material bio sorvente promissor, eficiente, barato e biodegradável.

Contudo, além de metais e outros compostos inorgânicos, os efluentes contêm também compostos orgânicos. Na literatura, existem poucos artigos que fazem referência a estudos destas misturas complexas. A maioria dos estudos é feita em efluentes com baixa salinidade ou em água doce, existindo poucos estudos com água salgada. Um dos estudos realizados com águas salinas foi o trabalho feito por Turner et al. (2007), onde foi avaliada a remoção de elementos do grupo da platina pela macroalga marinha, *Ulva lactuca*. As percentagens de metal removido foram cerca de 40% para o Rh, de 80% para o Pd e de 95% para o Pt, o que indica que a *Ulva lactuca* é eficaz na remoção destes elementos em águas marinhas.

Shams et al. (2014) estudaram a acumulação de Rh, Pd e Pt por microalgas marinhas, *Chlorella stigmatophora*, em água do mar. Definiram-se dois períodos de

acumulação: um curto, com um tempo de exposição de 24 horas e um longo com uma exposição de 156 horas. Verificou-se que nas exposições de curta duração, a ordem de remoção pela *C. stigmatophora* foi: Rh > Pd >> Pt, em todas as condições estudadas. Na exposição a longo prazo, constatou-se que a reatividade do Rh e, em particular, do Pt originaram taxas de remoção e de acumulação pela *C. stigmatophora* maiores para o Rh e semelhantes para o Pd e o Pt.

A macroalga *Ulva lactuca* é particularmente útil nos estudos de remoção de contaminantes devido à sua estrutura relativamente simples e ampla distribuição (Sari & Tuzen, 2008; Turner et al., 2007). É um tipo de alga verde comum, que pertence à divisão *Chlorophyta*, sendo facilmente encontrada nos mares e oceanos de todos os continentes, incluindo a Europa (Tian et al., 2015). Na Figura 1.1 encontra-se uma imagem da alga *Ulva lactuca*.



Figura 1.1: *Ulva lactuca* (em: [1])

Normalmente, as espécies *Ulva* têm um rápido crescimento devido a altas taxas fotossintéticas e a uma elevada capacidade de absorção de nutrientes, beneficiando da sua grande área superficial de células estruturalmente uniformes e fisiologicamente ativas (Ben-Ari et al., 2014; Chen et al., 2015; Sari & Tuzen, 2008).

No estudo de Henriques et al. (2015) os autores concluíram que a *Ulva lactuca* tem maior potencialidade na remoção de mercúrio em águas salinas, em comparação com outras espécies de algas (castanhas e vermelhas). A razão apontada foi o seu crescimento mais rápido, que levou a uma maior percentagem de Hg removido. Para além deste fator, também a área superficial é responsável pela sua boa capacidade de remoção, sendo estas algas fáceis de manter em laboratório, uma vez que são mais tolerantes a diferenças de temperatura e de luminosidade.

1.4. Avaliação da partição dos contaminantes inorgânicos nas algas

A sorção de contaminantes pela macroalga pode dever-se à sua ligação à parede celular, à membrana celular, às proteínas específicas de transporte, ou aos ligandos intracelulares (Desaunay & Martins, 2014; Hassler et al., 2004).

Segundo a classificação de Brown (Costas & López, 2001), no caso das plantas não vasculares, os contaminantes inorgânicos ligam-se de forma intercelular, extracelular e intracelular. Os contaminantes “intercelulares” encontram-se dissolvidos nas matrizes da parede celular, da membrana celular ou nas partículas existentes no talo da alga. Neste caso, os elementos não se encontram ligados às células. Os contaminantes “intracelulares” estão incluídos no citoplasma, nos vacúolos celulares e ligados à camada interna da membrana celular. Os contaminantes “extracelulares” estão na superfície externa da membrana celular ou sorvidos na parede celular, ou seja, encontram-se ligados a grupos funcionais (Costas & López, 2001; Pérez-Llamazares et al., 2010; Spagnuolo et al., 2013). Como esta ligação é um processo físico-químico rápido, reversível, e que não necessita de atividade biológica, os contaminantes “extracelulares” podem ser removidos utilizando um agente de extração (Costas & López, 2001). No entanto, a localização dos elementos não é normalmente alvo de estudo nos trabalhos envolvendo a biorremediação como forma de tratamento de águas (Costas & López, 2001; Hassler et al., 2004).

O conhecimento da partição do contaminante que se encontra nas células permite compreender os efeitos causados pela acumulação, uma vez que a ligação do contaminante com a célula influencia a natureza e a intensidade do efeito que os mesmos provocam (Costas & López, 2001; Hassler et al., 2004).

Várias técnicas para distinguir as frações de contaminantes ligados superficialmente e ligados internamente têm sido estudadas, nomeadamente, troca catiónica, lavagem com ácido, troca de isótopos, e utilização de agentes complexantes. Destas, a extração com ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) é a mais utilizada (Desaunay & Martins, 2014; Hassler et al., 2004). Normalmente expõe-se a biomassa a uma determinada concentração de EDTA, num curto intervalo de tempo, de modo a que a solução extratante compita com os grupos funcionais da superfície pelos contaminantes ligados (Costas & López, 2001; Hassler et al., 2004). Na Tabela 1.4 encontra-se um resumo das condições utilizadas em alguns estudos onde a partição celular dos elementos foi avaliada com EDTA.

Tabela 1.4: Resumo das condições utilizadas por alguns autores em estudos de extração com EDTA.

Agente extratante	Concentração	Tempo	Organismo	Observações	Referência
EDTA; Outros	Concentrações de EDTA de 10^{-4} - 10^{-1} M Para Ni, Cd e Pb não houve diferenças significativas com o aumento da concentração de 10^{-4} para 10^{-1} M. Para Cu e Zn, a eficiência aumentou para [EDTA] > 10^{-2} M. A comparação entre outros agentes extratantes foi realizada para concentração de 5×10^{-3} M.	A comparação entre agentes extratantes foi realizada para 1 min de extração. Foi avaliado o efeito do tempo (0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40 e 60 min). Para Pb, Cu e Zn não se verificaram diferenças para tempos superiores a 10 min. Para Ni e Cd o efeito do tempo só se verificou após 20 min.	Microalga verde, <i>Chlorella kesslerii</i> .	Não foram observadas diferenças significativas entre os vários agentes extratantes.	(Hassler et al., 2004)
EDTA	Solução de EDTA, 3×10^{-3} M em 0.6 M NaCl.	Agitação suave durante 15 min.	<i>Ulva lactuca</i> .	O Pd no interior da célula foi significativamente maior do que para o Cd e o Pb.	(Masakorala et al., 2008)
EDTA; Outros	Soluções com 5 concentrações (1×10^{-2} – 5×10^{-2} M). A concentração foi escolhida com base na maior capacidade de extração sem danos na membrana (aparentemente todas as [EDTA] testadas alteraram a permeabilidade da membrana). A concentração de EDTA aconselhada foi de 1×10^{-2} M.	<u>Metais extracelulares</u> : 500 mg peso fresco em 10 mL de solução durante 45+30 min com renovação da solução <u>Metais intracelulares</u> : amostra seca colocada 1M HNO ₃ , durante 10 min.	Musgo Terreste, <i>Pseudoscleropodium purum</i> .	A quantificação de K nos extratos é um indicador da integridade da membrana celular, uma vez que este se encontra localizado sobretudo internamente (Mg também pode ser usado embora não seja tão robusto).	(Pérez-Llamazares et al., 2010)
EDTA	Solução de oxalato de EDTA 1×10^{-1} M com a adição de NaCl (0.3 M) e KCl (0.01 M).	Extração durante 10 min.	Aqualcultura de algas para produção de biodiesel (não discriminam espécies).	Maior parte dos metais estava na fração interna (30% de Mn, 50-90% de Fe, Pb, Cu, V, Cd).	(Rothman et al., 2013)
EDTA	Soluções de EDTA 5×10^{-3} M.	Não é mencionado o tempo mas é referido um artigo, onde o tempo é de 20 min (remoção efetiva de Cu sem danificar células).	Microalga marinha <i>Chlorella stigmatophora</i> .	Os filtros contendo as algas foram lavados com 10 mL de água destilada antes de serem imersos na solução de EDTA.	(Shams et al. 2014)
EDTA	Soluções de EDTA 3×10^{-3} M em NaCl 0.6 M.	Extração durante 15 min em 10 mL de solução.	<i>Ulva lactuca</i> .	-	(Turner et al., 2009)
EDTA	Solução de EDTA 1×10^{-2} M.	Não referem o tempo.	Estirpes bacterianas, <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Paenibacillus macerans</i> .	As células foram lavadas previamente com água destilada (2 vezes) para remover o metal que não se encontrava ligado.	(Vishnoi et al., 2014)

1.5. Modelação matemática da cinética do processo de biorremocção

A cinética fornece informações relevantes sobre as taxas, as vias da reação e o tempo necessário para atingir o equilíbrio, ou tempo necessário para a conclusão do processo de remoção (Figueira et al., 2011). Por isso, o estudo da cinética é vital na avaliação da aplicabilidade real do processo de remoção, e para a otimização das condições de operação em grande escala (Ho et al., 2000).

Os modelos cinéticos podem dividir-se em modelos de reação e modelos de difusão. Os primeiros assumem o processo de sorção como um todo, enquanto os segundos pressupõem diferentes fases do processo, onde ocorrem fenómenos de transferência de massa (Ho et al., 2000).

Os modelos cinéticos de reação mais aplicados nos estudos de sorção são a equação de pseudo-primeira ordem de Lagergren e a equação de pseudo-segunda ordem de Ho (Wang & Chen, 2009). O modelo Elovich também tem sido muito utilizado na descrição cinética da quimiossorção (Ho & Mckay, 2004). Na Tabela 1.5 descrevem-se os modelos cinéticos acima referenciados.

Tabela 1.5: Modelos cinéticos de reacção.

Modelo cinético	Equação	Notas
Pseudo-primeira ordem (Lagergren)	$q_t = q_e (1 - e^{-k_1 t})$	Capacidade de adsorção
Pseudo-segunda ordem (Ho)	$q_t = \frac{q_e^2 k_2 t}{1 + q_e k_2 t}$	Capacidade de adsorção
Elovich	$q_t = \frac{1}{\beta} \ln(1 + \alpha \beta t)$	Quimiossorção

Nota: q_t e q_e são a quantidade de soluto sorvido por grama de sorvente, no tempo t e no equilíbrio, respetivamente; k_1 e k_2 são constantes de velocidade; α é a taxa de absorção inicial e β é a constante de desorção de Elovich;

2. Identificação dos objetivos do trabalho a realizar

O trabalho teve como principal objetivo avaliar o potencial de remoção de contaminantes inorgânicos presentes em águas contaminadas com diferentes salinidades, utilizando a macroalga viva *Ulva lactuca*.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Avaliar a eficiência da macroalga na biorremoção de elementos potencialmente tóxicos em soluções multimetálicas, contendo simultaneamente arsênio, cádmio, chumbo, cobre, crômio, mercúrio, manganês e níquel.

- Estudar o efeito da salinidade da solução no processo de biorremoção dos contaminantes inorgânicos.

- Estudar a influência da massa de macroalga na eficiência do processo de remoção dos contaminantes inorgânicos.

- Avaliar a repartição dos elementos removidos pela *Ulva lactuca*, retidos na superfície ou incorporados no interior da macroalga.

- Propor as melhores metodologias para a remoção dos diversos elementos estudados através da *Ulva lactuca*.

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais e reagentes

Ao longo de todo o trabalho utilizaram-se reagentes com grau de qualidade analítica, não havendo a necessidade de os purificar. A solução de ácido nítrico 65% (Suprapur®) e as soluções padrão de arsénio (1000 mg/L), cádmio (1000±2 mg/L), cobre (1001±2 mg/L), mercúrio (1001±2 mg/L) e chumbo (1000±2 mg/L) foram adquiridas na Merck. As soluções padrão de crómio (1000 mg/L) e manganês (1000 mg/L) foram adquiridas na Inorganic VenturesTM, enquanto a solução padrão de níquel (1000 mg/L) foi comprada na Spectrosol®. Todas as soluções de trabalho, incluindo os padrões usados para as curvas de calibração, foram obtidas através da diluição das soluções padrão comerciais correspondentes. Na preparação de soluções foram usadas pipetas Biohit Proline equipadas com pontas descartáveis. Todo o material de vidro utilizado nas experiências foi lavado com ácido nítrico (25% V/V) durante 24 horas e enxaguado abundantemente em água destilada antes da sua utilização.

3.2. Recolha da água do mar

A água do mar utilizada na manutenção das algas e nos ensaios de bioacumulação foi recolhida no porto da Barra (Aveiro, Portugal, 40°32'57"N, 8°46'30"W), em período de maré cheia. Posteriormente, no laboratório, a água foi filtrada usando filtros MilliporeTM de tamanho de poro de 0.45 µm, e armazenada num local fresco (4°C), sem contacto direto com a luz, até utilização. Realizou-se a sua caracterização, em termos de pH, salinidade e condutividade, recorrendo a medidores WTW (modelo 330i para salinidade e condutividade; modelo inoLab pH 720 para pH), a temperatura ambiente de 22°C. Foi efetuada também uma análise multielementar, por espetrometria de massa com plasma indutivo acoplado (ICP-MS).

3.3. Recolha e manutenção da *Ulva lactuca*

As algas, da espécie *Ulva lactuca*, foram recolhidas na Ria de Aveiro (Portugal, 40°35'12"N, 8°44'55"W), durante o período de maré baixa, e foram transportadas para o laboratório em sacos de plástico isotérmicos contendo água local. No laboratório, enxaguaram-se bem as algas com água do mar filtrada, para eliminar detritos e epibiontes trazidos do campo. Uma parte das algas foi imediatamente congelada em azoto líquido e

liofilizada, para posterior quantificação das concentrações iniciais dos contaminantes inorgânicos em estudo. As restantes algas foram transferidas para aquários transparentes, equipados com arejadores e contendo água do mar filtrada, enriquecida com meio Provasoli (Costa et al., 2011), sob luz natural (cerca de 12 h de luz:12 h de escuro), à temperatura ambiente de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Uma vez que se usaram macroalgas vivas, a massa utilizada vem expressa em peso fresco. Contudo, o tratamento dos dados é geralmente feito usando o peso seco do “sorvente”. Assim, é importante determinar o conteúdo médio em água, ou relação peso seco/peso fresco, da macroalga utilizada. A determinação da razão entre o peso fresco e peso seco da alga foi feita por gravimetria. Foram cortados pequenos discos com 40 mm de diâmetro a partir do talo saudável da alga, que foram imediatamente pesados (peso fresco), e colocados na estufa a 40°C , até se verificar uma estabilização do seu peso (peso seco).

3.4. Ensaio de biorremocão das misturas de contaminantes inorgânicos

Estudos anteriores demonstram que a macroalga viva, *Ulva lactuca*, e a sua biomassa inerte, são capazes de remover eficazmente Hg de soluções aquosas salinas (Figueira et al., 2016; Henriques et al., 2015). No entanto, nada se sabe acerca da capacidade de remoção de contaminantes desta alga verde em misturas complexas (elevado número de contaminantes). Assim, neste trabalho estudou-se a biorremocão de 8 contaminantes (As, Cd, Cu, Cr, Hg, Mn, Ni e Pb) presentes simultaneamente em águas salinas, usando a macroalga viva, *Ulva lactuca*.

Os testes de biorremocão foram realizados em frascos de vidro Schott Duran® de 1 L, onde as macroalgas (vivas) foram colocadas em contacto com água do mar à qual foram adicionados simultaneamente arsénio, cádmio, chumbo, cobre, crómio, manganês, mercúrio e níquel. As concentrações dos contaminantes inorgânicos utilizadas encontram-se na Tabela 3.1 e representam os valores máximos permitidos para as suas descargas em efluentes industriais (Decreto-Lei n.º 236/98). Deve-se salientar, contudo, que atualmente a descarga de cádmio e mercúrio, incluídos na lista das substâncias perigosas prioritárias, está proibida (Diretiva 2013/39/UE). Por isso, os valores de referência utilizados para estes contaminantes inorgânicos correspondem aos limites estipulados no Decreto-Lei n.º 236/98 (valores anteriormente permitidos).

Tabela 3.1: Concentrações de contaminantes inorgânicos utilizadas na preparação das soluções multielementares estudadas.

Elemento	As	Cd	Pb	Cu	Cr	Mn	Hg	Ni
Concentrações (mg/L)	1	0,2	1	1	2	2	0,05	2

A fortificação da água do mar com os contaminantes inorgânicos provocou uma diminuição do pH, que foi ajustado para o valor natural do pH da água do mar, recorrendo a uma solução de NaOH 1 M, preparada através da dissolução do respetivo sal em água ultrapura. Todas as soluções preparadas foram deixadas a pré-equilibrar durante 24 horas antes do início das experiências.

Avaliou-se o efeito da salinidade da água no processo de remoção dos contaminantes em estudo, tendo-se para isso utilizado uma massa de alga de 1,5 g/L, para duas salinidades: 35 (salinidade da água do mar) e 15 (salinidade de água de estuário). O efeito da salinidade na eficiência da biorremoção poderá relacionar-se com a especiação dos contaminantes inorgânicos na água, que afete a seletividade da alga pelo contaminante, e/ou que leve a interações competitivas. A água com salinidade 15 foi conseguida através da diluição da água do mar filtrada em água ultrapura. Os ensaios foram realizados com 1,5 g/L de massa de alga, com base num estudo anterior, onde se verificou que esta massa foi suficiente para a remoção de 99% do Hg presente em solução (Henriques et al., 2015).

Para além do estudo do efeito da salinidade da água, avaliou-se também o efeito da massa de alga *U. lactuca* na remoção dos contaminantes inorgânicos da solução, no pressuposto de que uma maior massa de alga tem maior área superficial e maior número de locais de ligação, podendo influenciar a percentagem de contaminantes inorgânicos removidos. Os ensaios de biorremoção foram conduzidos para as seguintes quantidades de alga viva: 1,5 g/L, 3,0 g/L e 6,0 g/L, em peso fresco. Nos estudos de Nikolaisen et al. (2011), referentes ao cultivo de macroalgas para fins energéticos, o maior rendimento para esta espécie foi obtido para uma densidade de alga de 4 kg/m², apesar de terem sido observadas taxas de crescimento máximas em valores de densidade de biomassa mais baixos. As quantidades utilizadas têm também em atenção a minimização dos resíduos finais (biomassa de alga rica em contaminantes inorgânicos).

Nas experiências foram utilizados pequenos discos de *Ulva lactuca*, com tamanho uniforme, cortados a partir do talo saudável das algas ($\varnothing = 58$ mm). Todos os pedaços de

algas foram aclimatados em água do mar limpa durante várias horas antes da exposição aos contaminantes inorgânicos.

Antes da adição da alga, foi retirada uma alíquota de cerca de 5 mL da solução contaminada, que corresponde ao tempo zero, para a determinação da concentração inicial real de contaminante inorgânico. Foi também recolhida outra alíquota de cerca de 4 mL para a medição do pH. A remoção de contaminantes inorgânicos pelas macroalgas vivas foi acompanhada durante 3 dias, através da determinação da concentração dos contaminantes inorgânicos na solução em intervalos de tempo definidos (1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas). A cada tempo, foram recolhidos 5-10 mL de amostra para um frasco *Schott* (25 mL) para quantificação de Hg, enquanto que para os outros contaminantes inorgânicos foram recolhidos 4 mL para um tubo de poliestireno. Todas as amostras foram imediatamente acidificadas a $\text{pH} \leq 2$, utilizando HNO_3 (65% m/v suprapuro), e armazenadas no frigorífico a 4°C até serem analisadas.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado, sendo que em paralelo decorreram sempre ensaios em branco (macroalgas em água do mar sem adição de contaminantes) e ensaios de controlo (água do mar com contaminantes inorgânicos, na ausência de macroalgas).

O pH foi medido diariamente ao longo dos ensaios, sem que tenha sido feito qualquer ajuste de pH, uma vez que isso poderia interferir com o metabolismo celular do organismo e com o processo de remoção (Vasconcelos & Leal 2001; Velásquez & Dussan, 2009). O acompanhamento da alteração do pH ao longo do tempo, teve como objetivo verificar a existência de possíveis alterações provocadas pela remoção dos contaminantes da solução, ou pelo metabolismo da alga, que pudessem afetar a sobrevivência e estabilidade das algas, bem como a especiação dos metais. Uma vez que, no processo natural de fotossíntese, é consumido mais CO_2 dissolvido do que aquele que é restituído pelas trocas gasosas, o pH da solução em contato com as algas tenderá a subir ligeiramente. A medição deste parâmetro poderá ser então um indicativo indireto da condição da alga. Verificou-se que em todas as soluções expostas à presença da macroalga existiu uma subida ligeira do pH, de um valor médio inicial de aproximadamente 8 até um valor médio de 9,3. Esta subida é explicada pelo processo de fotossíntese, não existindo diferenças significativas entre o comportamento observado nas soluções contaminadas e

nos brancos. Já na solução controle (solução contaminada na ausência de alga) verificou-se que o pH se manteve inalterado ao longo do ensaio.

No final das experiências, as macroalgas foram recolhidas, congeladas em azoto líquido e liofilizadas para posterior quantificação da concentração total de contaminantes inorgânicos removidos.

3.5. Avaliação da partição dos contaminantes inorgânicos na macroalga

Após terem terminado os ensaios de biorremediação, foram realizados estudos com o intuito de avaliar a fração dos contaminantes inorgânicos ligados superficialmente na alga e a fração de contaminantes inorgânicos acumulados internamente. Para isso, foram usadas várias soluções extratantes: água ultrapura e EDTA com concentrações de 0,1M, 0,01M e 0,001M (Hassler et al., 2004; Pérez-Llamazares et al., 2010).

Colocou-se um disco de alga ($\varnothing = 40$ mm) que tinha estado em contacto com os contaminantes num frasco *Schott* contendo 20 mL da solução extratante, durante 15 minutos, em agitação a 150 rpm. Posteriormente as concentrações dos contaminantes inorgânicos nos extratos e nos discos de alga foram quantificadas. Estes ensaios foram realizados em quadruplicado. O pH de todas as soluções extratantes foi ajustado para um valor de 8, de modo a mimetizar o pH da água do mar. O valor de pH não é geralmente mencionado na literatura, mas é importante, uma vez que o EDTA é insolúvel a pH muito baixo, e a acidez das soluções pode por si própria afetar a integridade das membranas das algas. Autores como Costas & López (2001) ou Pérez-Llamazares et al. (2010) defendem que a integridade da parede e membrana celulares poderá ser avaliada através da quantificação das concentrações dos iões K^+ e Mg^{2+} nos extratos, uma vez que estes iões estão maioritariamente no interior da alga.

3.6. Quantificação dos contaminantes inorgânicos em solução e na alga

3.6.1. Quantificação de mercúrio em solução

A quantificação de Hg em solução foi realizada por espectrofotometria de fluorescência atômica com gerador de vapor frio (AFS-CV). O equipamento utilizado foi um analisador de mercúrio PSA *Merlin Millennium* 10.025.

Este sistema utiliza três fluxos líquidos distintos (amostra, branco e redutor), bombas peristálticas, uma válvula de mistura, uma célula de separação gás-líquido, uma

membrana de secagem, um detetor de fluorescência e um processador de sinal (Cai, 2000). O agente redutor usado foi o SnCl_2 (2% m/v em HCl 10% v/v), e o branco foi água ultrapura. Uma corrente de árgon promove o movimento do Hg elementar dissolvido em solução (após a sua redução de Hg^{2+} a Hg^0). Esta técnica é muito sensível e seletiva e permite uma rápida análise da amostra (aproximadamente 2 min/réplica), possui limites de detecção baixos, na gama dos ng/L (Ewing, 1997).

A intensidade da radiação de ressonância emitida é utilizada para a quantificação do Hg, usando uma reta de calibração obtida previamente. Neste trabalho, só foram consideradas retas de calibração com uma relação linear entre a intensidade do sinal e a concentração das soluções padrão com um $R^2 > 0,9998$. As concentrações dos padrões utilizados foram: 0; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5 $\mu\text{g/L}$. A estabilidade da curva de calibração foi verificada regularmente através da leitura do sinal de soluções padrão. Todas as amostras foram analisadas em triplicado (desvio padrão relativo entre análises $\leq 5\%$), com leitura de pelo menos dois brancos (água ultrapura) entre amostras.

3.6.2. Quantificação dos restantes contaminantes inorgânicos em solução

A quantificação das concentrações de As, Cd, Pb, Cu, Cr, Mn e Ni em solução foi efetuada externamente, no Laboratório Central de Análises (LCA) da Universidade de Aveiro, por espectrometria de massa com plasma indutivo acoplado (ICP-MS). Nesta técnica analítica, a amostra é ionizada com uma fonte de plasma induzido e os iões são separados e quantificados usando um espectrómetro de massa (Seiler et al., 1994). O espectrómetro de massa divide e quantifica as moléculas ionizadas de acordo com a sua razão massa/carga (Ewing, 1997). É um método multielementar, pois proporciona a determinação sequencial e/ou simultânea de todos os elementos, tem alta resolução, fornece respostas rápidas (cerca de 1 minuto) e tem bons limites de detecção (Boumans, 1987).

Neste trabalho usou-se um ICP-MS X Series, equipado com um nebulizador Burgener (1 mL/min) e cones de níquel. As curvas de calibração para a quantificação dos contaminantes inorgânicos foram obtidas a partir de 9 padrões (0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10; 20; 50 e 100 $\mu\text{g/L}$) preparados por diluição de uma solução padrão multielementar certificada em soluções de ácido nítrico (2% v/v). Os limites de quantificação do método

para os diferentes elementos foram estipulados como sendo a concentração do menor padrão da reta de calibração. Todas as amostras foram previamente diluídas usando HNO₃ (2% V/V), de modo reduzir a carga de sólidos dissolvidos, evitando entupimento e interferências de matriz.

3.6.3. Quantificação de mercúrio na biomassa da *Ulva lactuca*

A concentração total de Hg nas macroalgas foi medida por espectrometria de absorção atômica, com decomposição térmica e amálgama de ouro, utilizando um equipamento LECO © AMA-254, tal como descrito por Costley et al. (2000). A análise é realizada diretamente na amostra (1 a 20 mg, em peso seco), sem digestão ou pré-tratamento específico, evitando-se desta forma perdas ou a contaminação de Hg, e ainda interferências de matriz.

A amostra sólida é introduzida no equipamento por uma barquinha de níquel, e é aquecida, seca e decomposta térmica e quimicamente num tubo de combustão, em atmosfera de oxigênio. O vapor de Hg formado é arrastados por um fluxo de oxigênio até uma amálgama de ouro, que retém seletivamente o elemento. O vapor de Hg é então libertado da amálgama por aquecimento, sendo arrastado até uma célula, onde a absorvância é medida a um comprimento de onda de 253,7 nm. A concentração do Hg é então quantificada em função da absorvância, por espectrometria de absorção atômica. O equipamento utilizado apresenta bons limites de detecção (0,01 ng de mercúrio) e a análise tem um tempo reduzido (cerca de 5 minutos) (US EPA, 2007).

Foram realizadas, pelo menos três análises para cada amostra, sendo aceite um desvio padrão relativo entre as repetições < 10%. Antes, e entre as amostras, foram realizadas análises de brancos (barquinha de níquel vazia). O controlo de qualidade dos resultados foi efetuado usando um material de referência certificado (CRM), o BCR 060 (*Lagarosiphon major*). O material de referência foi analisado todos os dias antes de se iniciarem as análises e no final do dia. As percentagens de recuperação (comparação do valor obtido com o valor verdadeiro) do material de referência estiveram entre 92 e 96% ao longo de todas as quantificações realizadas no âmbito deste trabalho.

3.6.4. Quantificação dos restantes contaminantes inorgânicos na biomassa da *Ulva lactuca*

A quantificação das concentrações do As, Cd, Pb, Cu, Cr, Mn e Ni nas macroalgas foi efetuada externamente no Laboratório Central de Análises (LCA) da Universidade de Aveiro, por espectrometria de massa com plasma induzido acoplado, tal como anteriormente indicado para as soluções. Contudo, foi necessário realizar o pré-tratamento das amostras, nomeadamente a sua digestão em meio ácido.

A digestão das amostras foi feita em tubos de teflon. Antes de utilizados, os tubos de teflon foram lavados com água da torneira, posteriormente perpez-se 2/3 do seu volume com HNO₃ (40%) + HF (20%) e levaram-se a um micro-ondas (programa a 150°C). Após este procedimento, os tubos foram lavados com água destilada e passados por água ultrapura. Nos tubos de teflon colocaram-se aproximadamente 200 mg de amostra e 2 mL de HNO₃ (65% V/V). Os tubos foram colocados num micro-ondas (modelo CEM Mars 5), e usou-se um programa em que a amostra foi sujeita 5 minutos a um aquecimento até atingir os 170°C, permaneceu a essa temperatura durante 10 minutos, foi depois arrefecida e adicionaram-se 250 µL de H₂O₂, tendo-se deixado em repouso durante 20 minutos antes de aplicar novo ciclo de micro-ondas. No final, as amostras foram recolhidas para tubos de polietileno de 25 mL, perfazendo-se o seu volume com água ultrapura.

O controlo de qualidade dos resultados foi feito através da quantificação de brancos de digestão (mesmos reagentes utilizados, mas sem amostra), que estiveram sempre abaixo do limite de quantificação, e usando um material de referência certificado (CRM), o BCR 060, digerido seguindo o mesmo procedimento das amostras. As percentagens de recuperação médias foram de 89±6% para o As, de 100±5% para o Cd, de 103±2% para o Pb, de 92±7% para o Cu, de 96±7% para o Cr, de 95±3% para o Mn e de 100±5% para o Ni.

3.7. Avaliação dos resultados de biorremoção

A partir do momento em que a *Ulva lactuca* entra em contacto com a solução contaminada inicia-se o processo de bio sorção/bioacumulação dos contaminantes inorgânicos. A biorremoção ocorrerá até à remoção total dos contaminantes inorgânicos da solução, ou até que seja atingido um equilíbrio, partindo do princípio que decorreu o período de tempo necessário para tal (Demirbas, 2008). Assim, espera-se que ao longo do

tempo a concentração dos contaminantes inorgânicos em solução diminua, enquanto a sua concentração na macroalga aumente.

Os dados experimentais são apresentados através da concentração normalizada (C_t/C_0) de contaminante em solução ao longo do tempo, obtida a partir da razão entre a concentração inicial de contaminante em solução (C_0 , $\mu\text{g/L}$), e a concentração de contaminante após um período de tempo t (C_t , $\mu\text{g/L}$). A utilização da concentração normalizada permite uniformizar os resultados experimentais, possibilitando a sua comparação.

A sorção dos contaminantes inorgânicos pelas macroalgas pode ser definida como a quantidade de contaminante ligada por unidade de massa num dado momento t (q_t , $\mu\text{g/g}$). Essa quantidade pode então ser deduzida a partir do balanço de massa entre a concentração inicial de contaminante na solução (C_0 , $\mu\text{g/L}$) e a concentração depois de um determinado período de tempo de contacto t (C_t , $\mu\text{g/L}$):

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t)}{m} \times V \quad (1)$$

Onde m (g) representa a massa de macroalga utilizada (em peso seco) e V (L) o volume de solução (Volesky, 2007). Quando o equilíbrio é atingido, $t=t_e$, $q_t=q_e$ e $C_t=C_e$ (concentração residual do contaminante em solução).

O desempenho de um processo de remoção pode ainda ser avaliado através da percentagem de remoção (R , %), isto é, através do cálculo da percentagem de metal que foi removido da solução pela alga:

$$R (\%) = \frac{(C_0 - C_t)}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

3.7.1. Modelação cinética dos dados de cinética de biorremoção

Neste trabalho a cinética do processo de biorremoção de contaminantes pela macroalga viva foi avaliada pela aplicação dos três modelos cinéticos de reação mais comuns, nas suas formas não-lineares (El-Khaiary & Malash, 2011), nomeadamente o modelo de pseudo-primeira ordem de Lagergren, o modelo de pseudo-segunda ordem de Ho e o modelo de Elovich, já apresentados na Introdução.

3.7.2. Análise estatística dos dados

Os gráficos, a modelação cinética e a análise estatística dos dados foi realizada com recurso ao software GraphPad Prism 6.0. Esta ferramenta utiliza como método de ajuste os mínimos quadrados e o método de Marquardt e Levenberg, que combina dois outros métodos, o método de descendência linear e o método de Gauss-Newton para ajustar as variáveis. O coeficiente de determinação (R^2) e o desvio padrão dos resíduos ($S_{y.x}$) foram analisados a fim de avaliar a qualidade do ajuste e comparar os modelos. O erro relativo (E_r) entre os valores experimentais e previstos de q_e também foi calculado. Estes parâmetros estatísticos podem ser matematicamente definidos por:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2} \quad (3)$$

$$S_{y.x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{df}} \quad (4)$$

$$E_r = \frac{|y_i - \hat{y}|}{y_i} \times 100 \quad (5)$$

Onde y_i são valores de dados experimentais, \hat{y} são os valores previstos, \bar{y} é a média dos dados experimentais e df é o número de graus de liberdade (igual ao número de dados menos o número de parâmetros de ajuste).

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização sumária das amostras de água do mar

Os ensaios de biorremocão foram realizados com água do mar colhida na região costeira de Aveiro, tendo-se procedido à sua caracterização sumária, nomeadamente em termos de pH, salinidade, condutividade e análise multielementar. Nas Tabela 4.1 e 4.2 encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 4.1: pH, salinidade e condutividade da água do mar usada neste trabalho.

pH	Salinidade (g/L)	Condutividade (mS/cm)
7,9	35	54,3

Tabela 4.2: Concentração de alguns elementos maioritários e minoritários na água do mar. Considerou-se como limite de quantificação o valor do padrão de concentração mais baixa.

Maioritários		Minoritários			
Elemento	Concentração (mg/L)	Elemento	Concentração (µg/L)	Elemento	Concentração (µg/L)
B	5	Be	< 0.1	Zn	< 40
Na	13290	Al	178	As	< 20
Mg	1757	Si	< 2000	Se	186
K	573	P	322	Rb	134
Ca	441	Cr	16	Mo	< 40
Sr	9	Mn	4	Cd	< 2
		Fe	65	Sb	< 2
		Co	< 2	Ba	7
		Ni	< 20	Pb	3
		Cu	< 20		

Verificou-se que os valores de pH, salinidade e condutividade, estão dentro do esperado, de acordo com o reportado para água do mar da costa portuguesa (Figueira et al., 2016; Henriques et al., 2015). Relativamente à composição multielementar observou-se que os catiões maioritários são, por ordem decrescente Na > Mg > K > Ca > Sr > B como referido em Rocha et al., (2016), encontrando-se os elementos vestigiais geralmente em concentrações abaixo do limite de quantificação (valor do padrão de concentração mais baixa).

4.2. Caracterização sumária das amostras de alga

4.2.1. Conteúdo de água

Verificou-se que, em média $75\pm 2,5\%$ ($n=20$ réplicas) da alga era constituída por água, ou seja, a sua relação peso fresco/peso seco era de aproximadamente 4. Este valor está de acordo com os valores referidos por Bruhn et al. (2011) para a *Ulva lactuca* da costa dinamarquesa ($77\pm 2,7\%$ de teor de água), e da Nova Zelândia ($80\pm 0,43\%$ de teor de água) por Lamare & Wing (2001).

4.2.2. Concentração dos elementos maioritários e minoritários

Na Tabela 4.3 encontram-se os resultados da análise multielementar da biomassa da macroalga, logo após recolha no campo.

Tabela 4.3: Concentração ($\mu\text{g/g}$) de elementos maioritários e minoritários na macroalga *Ulva lactuca* usada neste estudo.

Elementos	Concentração ($\mu\text{g/g}$)	Elementos	Concentração ($\mu\text{g/g}$)	Elementos	Concentração ($\mu\text{g/g}$)
Na	41842	Rb	10	U	0,1
Mg	28911	Cu	5	Dy	0,1
Ca	26160	Ni	3	Sm	0,1
K	24191	Li	2	Eu	0,1
P	1988	V	2	Gd	0,1
Al	1271	Cr	2	Yb	0,04
Fe	569	Pb	2	Lu	0,03
B	94	Co	1	Er	0,03
Mn	67	Ce	1	Hg	0,03
Sr	59	La	0,6	Be	< 0,5
Zn	48	Nd	0,6	Tl	< 0,5
Ba	19	Cd	0,4	Ho	< 0,25
Se	11	Cs	0,2	Tm	< 0,125
As	10	Pr	0,1		

Verifica-se que os elementos que se encontram em maior quantidade nas macroalgas são os que existiam também maioritariamente na água do mar, nomeadamente, o Na, o Mg, o Ca e o K, estando de acordo com o reportado em Rupérez, (2002). O P, Al e Fe estão também presentes em concentrações relevantes. Os conteúdos dos elementos

vestigiais (potencialmente contaminantes) são baixos, estando na maior parte dos casos de acordo com os valores obtidos por El-Naggar & AL-Amoudi, (1989) e por Topcuoglu et al., (2003).

4.3. Biorremocão de contaminantes pela macroalga *Ulva lactuca*

4.3.1. Efeito da salinidade da água

Este estudo comparou o efeito da salinidade (valores de 35 e 15) no processo de remoção para uma massa de macroalga de 1,5 g/L (Henriques et al., 2015). Na Figura 4.1 encontra-se representada a variação das concentrações normalizadas dos contaminantes inorgânicos em estudo, ao longo do tempo, para os dois valores de salinidade mencionados.

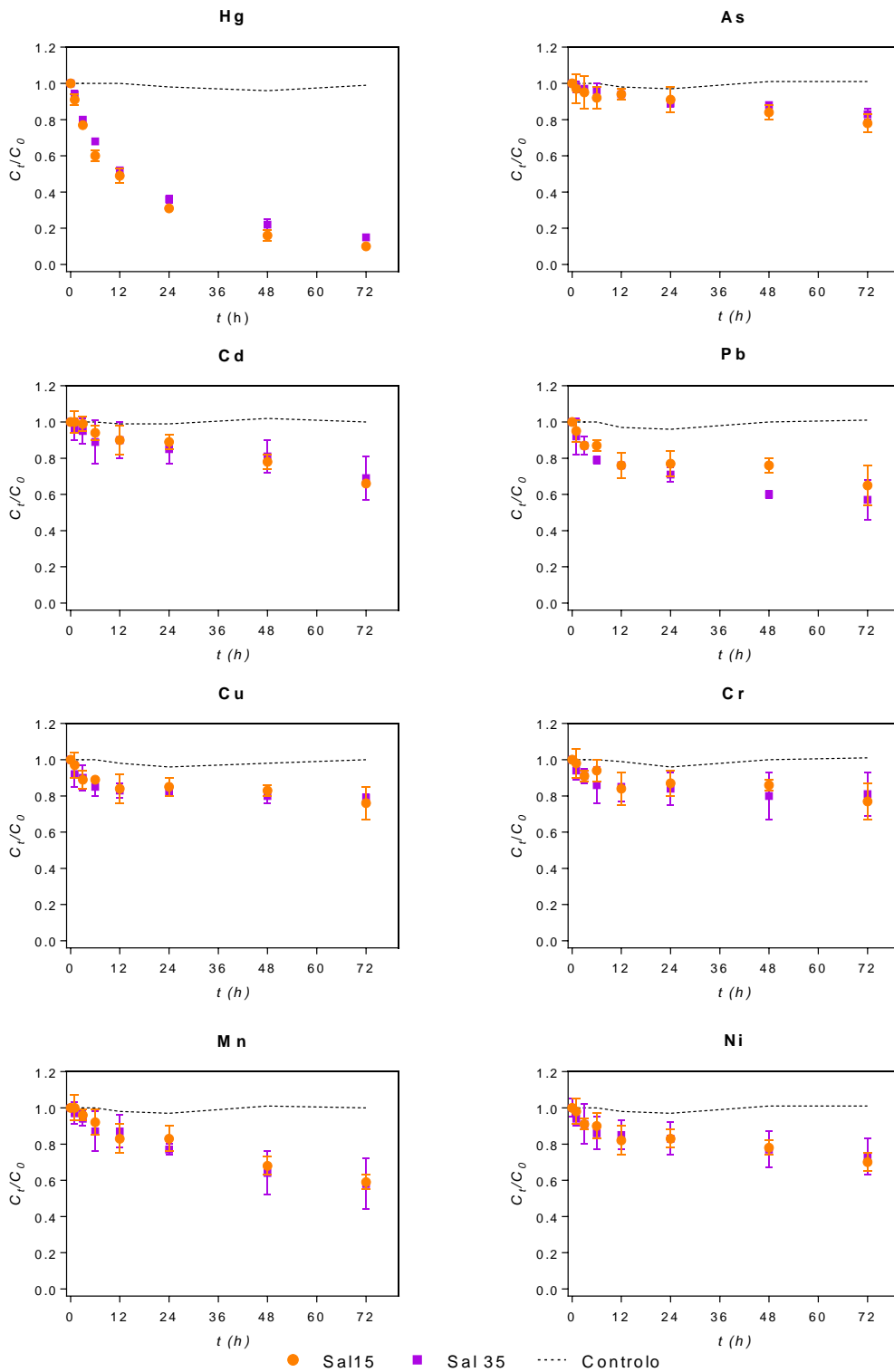


Figura 4.1: Variação da concentração normalizada dos contaminantes inorgânicos em mistura ao longo do tempo, para duas salinidades (35 e 15). Valores apresentados correspondem à média de 3 réplicas, e as barras de erro representam o respectivo desvio padrão. Condições experimentais: 1,5 g, peso fresco de macroalga, por litro de solução; pH inicial=7,8.

A análise da Figura 4.1. permite concluir que, de um modo geral, não se verificaram diferenças significativas entre as remoções dos contaminantes pela macroalga nas salinidades estudadas, ou seja, a capacidade de sorção da *Ulva lactuca* praticamente não é afetada pela alteração de salinidade, numa amplitude que vai desde uma salinidade típica de água do mar até uma salinidade que pode ser encontrada numa água de estuário. Estes resultados associados aos da variação das concentrações nos controlos, permite concluir que, ao longo dos ensaios, não ocorreram perdas de contaminantes, por adsorção às paredes do vidro, por precipitação ou por outros processos, podendo as reduções nos níveis de contaminantes nas soluções que estiveram em contato com as macroalgas ser atribuídas à sorção dos mesmos.

Globalmente, a variação no tempo das concentrações segue um padrão semelhante para todos os contaminantes inorgânicos. O perfil cinético da concentração em solução caracteriza-se por uma fase de sorção rápida nas primeiras horas de exposição, seguida de uma fase em que o seu decréscimo é mais lento. Henriques et al. (2015) indicam que uma captação inicial rápida corresponderá à sorção química na superfície das células e, eventualmente, à difusão simples nos espaços intercelulares, estando a sorção rápida no início relacionada com a elevada força motriz que existe inicialmente, uma vez que a superfície das algas se encontra livre de contaminantes, sendo a captação essencialmente passiva nesta fase (independente do metabolismo), e de natureza físico-química. Em seguida, ocorrerá simultaneamente a ligação externa e o transporte para o interior, assim como acumulação interna dos contaminantes (dependente do metabolismo).

4.3.2. Efeito da massa de macroalga

A uma maior massa de alga corresponde uma maior área superficial e um maior número de locais de ligação, mas Nikolaisen et al. (2011) referem que o uso de grande quantidade de alga relativamente ao volume da água (ou efluente) a purificar pode inibir o seu crescimento e sobrevivência. Neste estudo foram testadas três massas de alga: 1,5 g/L, 3,0 g/L e 6,0 g/L. Na Figura 4.2 encontram-se representados os resultados obtidos, ao longo do tempo, para cada um dos contaminantes inorgânicos, para as diferentes quantidades de macroalga utilizadas. É possível concluir que aumentando a massa de alga se obtêm remoções mais elevadas, com o melhor desempenho a ser obtido para massa de 6,0 g/L. Tal como nos ensaios anteriores, verificou-se que a concentração dos

contaminantes inorgânicos nas soluções de controlo se mantiveram sem alteração ao longo do tempo.

Para o Hg, o aumento da biomassa de macroalga contribuiu para um incremento da quantidade do elemento removido e para uma maior taxa de remoção na fase inicial (12 horas de exposição). Ao fim deste período, as concentrações de Hg em solução eram 26, 14 e 6 $\mu\text{g/L}$, respetivamente, para 1,5, 3,0 e 6,0 g/L de macroalga. Ao fim de 48 horas, as percentagens de remoção foram 64, 78 e 95%, respetivamente, para 1,5, 3,0 e 6,0 g/L, alcançando valores de 85, 96 e 98%, ao fim de 72 horas. Embora o aumento de biomassa tenha levado a uma maior sorção de metal, a quantidade de Hg na macroalga foi menor, devido ao aumento de biomassa, obtendo-se valores de 121, 72 e 35 $\mu\text{g/g}$ para 1,5, 3,0 e 6,0 g/L, respetivamente.

Para o As, observou-se que o incremento na dose de macroalga levou a um aumento da remoção deste elemento, mas a remoção é mais lenta quando comparada com a do Hg. Ao fim de 12 horas a concentração de As era de 940, 758 e 818 $\mu\text{g/L}$ para massas de 1,5, 3,0 e 6,0 g/L de alga, respetivamente, passando para 889, 780 e 761 $\mu\text{g/L}$ às 48 horas, respetivamente. No final da experiência alcançaram-se eficiências de remoção de 18, 33 e 48%, para 1,5, 3,0 e 6,0 g/L de biomassa. Tal como para o Hg, as concentrações finais de As na macroalga diminuíram com o aumento da biomassa utilizada, sendo de 530, 471 e 303 $\mu\text{g/g}$ para 1,5, 3,0 e 6,0 g/L, respetivamente.

Relativamente ao Cd também se observou um aumento da quantidade de metal removido com o incremento da massa de alga, atingindo-se concentrações em solução, ao fim de 12 horas, de 180 $\mu\text{g/L}$ para massas de alga de 1,5 e 3 g/L e de 168 $\mu\text{g/L}$ para 6,0 g/L. Após 48 horas as concentrações de Cd em solução foram 161, 148 e 134 $\mu\text{g/L}$, para 1,5, 3,0 e 6,0 g/L de macroalga, respetivamente. No final do ensaio, constatou-se que com a maior massa de alga se obtiveram menores concentrações de metal em solução, respetivamente, 137, 99 e 89 $\mu\text{g/L}$ para 1,5, 3,0 e 6,0 g/L. A quantidade final de Cd na biomassa da alga foi menor para a maior massa de alga estudada (169, 109, 73 $\mu\text{g/g}$ para 1,5, 3,0 e 6,0 g/L, respetivamente).

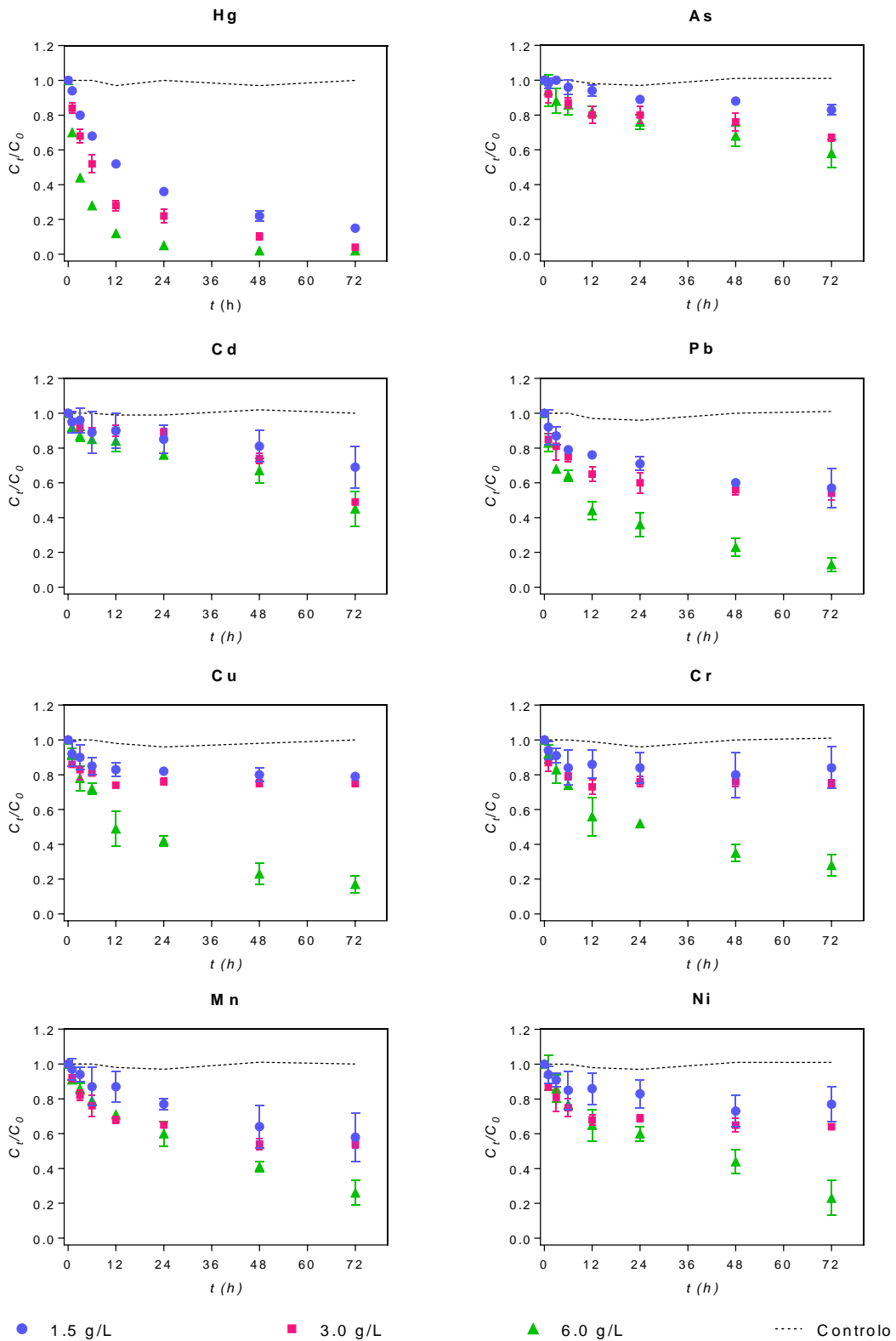


Figura 4.2: Variação das concentrações normalizadas dos contaminantes inorgânicos, ao longo do tempo, para as diferentes massas de alga (1,5, 3,0 e 6,0 g/L, peso fresco de macroalga por volume de solução). Valores apresentados correspondem à média de 3 réplicas e as barras de erro representam o desvio padrão; pH inicial=7,8.

No caso do Pb, no final do ensaio não se registaram diferenças relevantes para as massas 1,5 e 3,0 g/L, conseguindo-se remoções de 43 e 46%, respetivamente. Quando se aumentou a massa de alga para 6 g/L verificou-se uma maior remoção, atingindo um valor de 87% no final da experiência. Após 12 horas verificavam-se diferenças entre as concentrações de Pb em solução para as 3 massas de alga, respetivamente, 755, 648 e 442 µg/L para 1,5, 3,0 e 6,0 g/L. A quantidade de Pb na biomassa diminuiu com o aumento da massa utilizada, sendo de 1139, 641 e 513 µg/g, para 1,5, 3,0 e 6,0 g/L.

Tal como se verificou para o Pb, a remoção de Cu é semelhante para as massas 1,5 g/L e 3,0 g/L de alga, alcançando-se concentrações deste metal em solução, ao fim de 48 horas, de 802 e 752 µg/L, respetivamente. Estas concentrações são superiores às alcançadas com 6,0 g/L de alga, 232 µg/L. No final da experiência, as percentagens de remoção com 1,5 e 3,0 g/L de alga foram semelhantes (21 e 25%, respetivamente), mas inferiores à obtida com 6,0 g/L (86%). Relativamente à quantidade de metal que ficou sorvida na biomassa, constatou-se que o valor mais elevado (490 µg/g) correspondeu à maior massa de alga (451 e 364 µg/g, para 1,5 e 3,0 g/L, respetivamente).

Para o Cr, não foram observadas diferenças entre as massas de 1,5 g/L e 3,0 g/L, sendo a remoção em ambos os casos inferior à conseguida com 6,0 g/L de alga. Após 12 horas de contacto, a concentração de metal em solução era de 1702, 1551 e 1113 µg/L, respetivamente, para massas de *U. lactuca* de 1,5, 3,0 e 6,0 g/L. Ao fim de 48 horas, as percentagens de remoção foram 24% para 1,5 e 3,0 g/L e 65% para 6 g/L. No final alcançaram-se valores de 16, 25 e 72% de remoção para 1,5, 3,0 e 6,0 g/L, respetivamente. Com a biomassa de 6 g/L conseguiu-se o maior teor Cr na macroalga (1135 µg/g), sendo a quantidade de Cr na biomassa superior para 1,5 g/L comparativamente com 3,0 g/L (947 e 719 µg/g, respetivamente).

No caso do Mn, verificaram-se algumas diferenças entre as diferentes massas de alga, obtendo-se a maior remoção deste metal com a quantidade de alga mais elevada. As concentrações de Mn em solução, após 12 horas, foram 1730 µg/L para 1,5 g/L, 1357 µg/L para 3,0 g/L, e 1421 µg/L para 6,0 g/L, e após 48 horas as concentrações eram 1275, 1088 e 826 µg/L, respetivamente para 1,5, 3,0 e 6,0 g/L. As percentagens de remoção finais foram de 42, 46 e 74 %, para uma biomassa de 1,5, 3,0 e 6,0 g/L, respetivamente. Os teores finais de Mn na macroalga foram menores com o aumento da dose de alga utilizada (2517, 1345 e 1133 µg/g para 1,5, 3,0 e 6,0 g/L, respetivamente).

No que se refere ao Ni, verificou-se que com o aumento da massa de alga há uma maior remoção deste metal, uma vez que após 12 horas, com 1,5 g/L de alga atingem-se concentrações de metal em solução de 1698 µg/L, com 3,0 g/L de 1371 µg/L, e com 6,0 g/L de 1295 µg/L. Após 48 horas as concentrações de Ni em solução foram 1548, 1299 e 876 µg/L, respetivamente para 1,5, 3,0 e 6,0 g de alga por litro. No final da experiência atingiram-se percentagens de remoção de 23, 36 e 77%, para as massas 1,5, 3,0 e 6,0 g/L, respetivamente. Relativamente à quantidade de Ni que ficou na alga, registou-se o menor teor para 3 g/L (886 µg/g) e o maior para 1,5 g/L (1229 µg/g). Para a dose de 6,0 g/L o conteúdo final de Ni na biomassa foi de 1035 µg/g.

De um modo geral, pode concluir-se que com a massa de 6,0 g/L se verifica maior remoção dos elementos em solução. Para o Pb, Cu e Cr, não se verificaram diferenças relevantes entre 1,5 g/L ou de 3,0 g/L de alga. O mercúrio foi o metal mais removido, sendo a sua remoção também mais rápida do que a dos outros contaminantes inorgânicos. Os perfis cinéticos das curvas para 6,0 g/L mostraram que o equilíbrio não foi atingindo nas 72 horas do ensaio, indicando que a remoção iria continuar, levando a concentrações ainda mais baixas. Ibrahim (2011) estudou a influência da quantidade de biomassa (entre 1-40 g/L) de algas no processo de bio sorção de alguns metais, concluindo que até 10 g/L a capacidade de bio sorção aumenta. Sari & Tuzen (2008) realizaram um estudo semelhante ao de Ibrahim (2011) para a biomassa de *Ulva lactuca*, no qual analisaram o efeito da quantidade de biomassa (2 a 40 g/L) na remoção de Pb e Cd. Os autores constataram que o máximo de bio sorção foi atingido para 20 g/L de alga.

4.4. Avaliação da eficiência do processo de tratamento da água proposto

Confirmada a ausência da influência da salinidade na remoção dos contaminantes em mistura, para os valores de salinidade estudados (15 e 35), e avaliado o efeito que a quantidade de alga utilizada tem no processo, é possível comprovar a eficiência da macroalga usada neste trabalho num processo de tratamento de água. Analisadas as percentagens de remoção finais para os diferentes contaminantes inorgânicos e as respetivas concentrações residuais em solução, é possível identificar quais têm maior afinidade para a *Ulva lactuca*. Na Figura 4.3 encontra-se uma representação gráfica de radar indicativa das percentagens de remoção dos contaminantes inorgânicos, para as diferentes massas de alga.

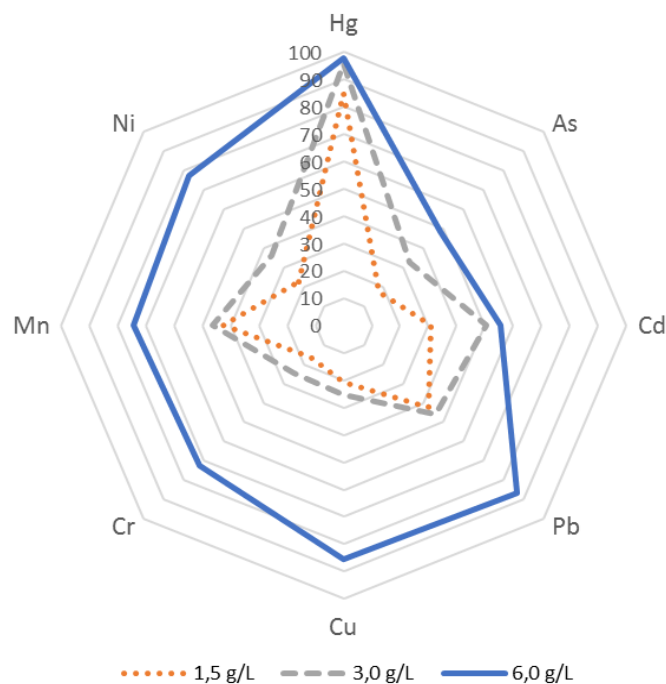


Figura 4.3: Percentagens de remoção obtidas para os diferentes contaminantes inorgânicos, usando as massas de alga: 1,5, 3,0 e 6,0 g/L. Os valores apresentados correspondem à média de 3 réplicas.

A análise da Figura 4.3 permite confirmar que, de um modo geral, o aumento da massa de alga contribuiu para que ocorram maiores percentagens de remoção, embora, a utilização de 3,0 g/L não traga vantagens relevantes quando comparada com 1,5 g/L. Pelo contrário, a utilização de 6,0 g/L traz um aumento relevante no processo de remoção, em especial para elementos como o Cu, Cr, Ni e Pb. Para estes elementos as eficiências de remoção aumentaram de 21 para 86% (Cu), de 16 para 72% (Cr), de 23 para 77% (Ni) e de 43 para 86% (Pb), quando a quantidade de alga usada passou de 1,5 para 6,0 g/L, respetivamente. Em valores médios, a eficiência de remoção para a massa de 1,5 g/L foi cerca de $35 \pm 22\%$, enquanto para 3,0 e 6,0 g/L, foi de cerca de $45 \pm 23\%$ e $75 \pm 16\%$, respetivamente. De um modo geral, as percentagens de remoção mais elevadas foram observadas para o Hg (85-98%), enquanto as mais baixas se registaram para o As (18-48%). Este comportamento poderá estar relacionado com a especiação destes elementos em solução, uma vez que, de acordo com uma simulação realizada com recurso ao Visual MINTEQ, e usando como “parâmetros de entrada” a caracterização físico-química da água à qual foi adicionada a mistura de contaminantes, o Hg existe em solução maioritariamente

na forma de cloro-complexos com carga negativa (21% HgCl_3^- , 75% HgCl_4^{2-}) enquanto o As existe quase exclusivamente na forma de hidrogeno-arseniato (96% HAsO_4^{2-}).

Resumindo, em termos de percentagens de remoção, para a maior massa de alga estudada, a ordem registada foi: Hg (98%) > Pb (87%) > Cu (86%) > Ni (77%) > Mn (74%) > Cr (72%) > Cd (56%) > As (48%).

Analisando as concentrações residuais dos elementos em solução, com a utilização de 6 g/L de alga foi possível atingir valores de Hg em solução de 1 $\mu\text{g/L}$, que corresponde ao valor máximo admissível para este metal em águas de consumo (Decreto-lei 236/98). Para o As, conseguiu-se alcançar um valor de 516 $\mu\text{g/L}$, que é cerca de metade do valor inicial, mas ainda cerca de 5 vezes o valor máximo recomendado para este metaloide em águas de rega (100 $\mu\text{g/L}$) (Decreto-lei 236/98). No que diz respeito ao Cd, conseguiu-se uma concentração final de 89 $\mu\text{g/L}$, ou seja, um valor próximo do máximo admissível para águas de rega (50 $\mu\text{g/L}$) (Decreto-lei 236/98). Relativamente ao Pb, a concentração residual foi 133 $\mu\text{g/L}$, um valor cerca de 2 vezes o valor máximo admissível para água de consumo humano (50 $\mu\text{g/L}$) (Decreto-lei 236/98). No caso do Cu, alcançou-se um valor na ordem do obtido para o Pb, nomeadamente 145 $\mu\text{g/L}$, que é ligeiramente superior ao valor da atual da norma de qualidade ambiental para este metal em água superficial (100 $\mu\text{g/L}$) (Decreto-Lei 103/2010; Decreto-lei 236/98) e a concentração final obtida é inferior ao valor máximo recomendável para águas de rega (200 $\mu\text{g/L}$) (Decreto-lei 236/98). Para o Cr e Mn conseguiram-se concentrações residuais de 554 $\mu\text{g/L}$ e 454 $\mu\text{g/L}$, respetivamente, que representam cerca de 5 e 2 vezes os seus valores máximos recomendáveis para águas de rega (100 e 200 $\mu\text{g/L}$, respetivamente) (Decreto-lei 236/98). Para o Ni, a macroalga permitiu obter um valor semelhante ao limite máximo recomendável para águas de rega (500 $\mu\text{g/L}$) (Decreto-lei 236/98).

Podemos concluir que utilizando 6,0 g/L de macroalga, para o Hg e o Cu se alcançaram valores inferiores aos respetivos limites para águas de consumo humano, enquanto que para o Ni, Pb e o Cu foram cumpridos os critérios legais para águas de rega. Contudo, para o As, Cd, Cr e Mn apenas se alcançaram valores que podem ser considerados próximos dos recomendáveis para águas de rega. Estas diferenças salientam a importância destes dados para avaliar o reuso da água para fins distintos. De notar, no entanto, que os perfis cinéticos das curvas de remoção (Figura 4.2) indicam que, com exceção do Hg, para nenhum dos contaminantes foi atingido o equilíbrio, no período em

que decorreram os ensaios, ou seja, se se prolongasse o tempo de permanência da macroalga na solução, a remoção continuaria, e talvez pudessem ser alcançados esses limites. Estes resultados evidenciam a potencialidade desta macroalga viva, como base de um método alternativo de tratamento de água, em que razão massa de alga/volume de solução mais eficiente, para as condições testadas, é 6,0 g/L. Conclui-se também que serão necessários diferentes tempos de exposição para os vários contaminantes.

De salientar que, para uma análise mais adequada da seletividade da macroalga para os diferentes contaminantes, se deveria ter usado a mesma concentração molar inicial para cada um deles. As concentrações iniciais dos contaminantes inorgânicos estudados foram diferentes, pois o que se pretendia era uma aproximação à realidade de um efluente (usando os valores limite para descarga). De facto, um hiato que se verifica na maioria dos artigos encontrados na literatura é que as concentrações iniciais dos contaminantes estudados são geralmente muito superiores àquelas que podem ser encontradas nos efluentes ou nos sistemas aquáticos que são afetados pelas descargas dos mesmos. Embora se reportem elevadas percentagens de remoção nesses estudos, o que se verifica é que as concentrações finais dos contaminantes em solução são, na maioria dos casos, superiores àquelas permitidas por lei, falhando assim nos critérios de qualidade. Por estas razões também se torna difícil comparar a capacidade de remoção da macroalga viva em estudo com outros biossorbentes (Henriques et al., 2015).

É possível verificar ainda que diferentes percentagens de remoção podem ter relevância diferente. Por exemplo, no caso do Hg conseguiu-se uma percentagem de remoção próxima de 100%, tendo a quantidade deste metal em solução passado de 0,25 μmol para 0,01 μmol , enquanto que para o As apenas se alcançou uma percentagem de remoção de cerca de 50%, contudo, a quantidade deste metal em solução diminuiu de 13,4 μmol para 6,89 μmol , aproximadamente. Conclui-se facilmente que, embora a percentagem de remoção do Hg tenha sido maior, foi removida uma maior quantidade de As do que de Hg da solução.

Na literatura, encontram-se referências a estudos multimetálicos com poucos metais (geralmente misturas binárias ou ternárias). Um dos artigos que se focou em soluções multimetálicas e que utiliza as mesmas concentrações de metais avaliadas nesta investigação, é o estudo de Figueira et al. (2016), mas neste trabalho apenas foram estudadas misturas ternárias (Hg, Cd e Pb), verificando-se que a remoção do Hg não é

inibida pela presença de Cd e Pb, enquanto que a remoção de Pb pode ser favorecida pela presença dos outros metais. No que diz respeito ao Cd, a sua remoção não foi eficaz em nenhuma das condições estudadas. Nesse artigo, que usou resíduos secos de biomassa de *U. lactuca*, obtiveram-se percentagens de remoção de 98% para o Hg, 26% para o Pb, e 3,0% para o Cd, partindo de concentrações iniciais de contaminantes iguais às utilizadas neste estudo. Comparativamente, constata-se que no presente estudo (que é uma mistura muito mais complexa) se obtiveram percentagens de remoção superiores para o Cd (31%) e Pb (43%), ainda que ligeiramente menos Hg tenha sido removido (85%). Fica assim, evidente a vantagem de utilizar a espécie viva em contrapartida à utilização dos resíduos secos da biomassa.

4.5. Modelação cinética do processo de remoção de contaminantes com a macroalga

Na Figura 4.4, 4.5 e 4.6 encontram-se representados os ajustes dos dados obtidos usando três modelos cinéticos (pseudo-primeira ordem de Lagergren (PFO), pseudo-segunda ordem de Ho (PSO) e de Elovich), para cada um dos contaminantes, e para as diferentes massas de alga usadas, 1,5 g/L, 3,0 g/L e 6,0 g/L, respetivamente. Na Tabela 4.4 encontram-se os parâmetros estimados e a qualidade do ajuste de cada modelo, que pode ser aferida através dos valores de R^2 e de $S_{y,x}$ (quanto maior for o valor de R^2 e menor o valor de $S_{y,x}$ melhor será o ajuste do modelo). Através do software utilizado foi ainda possível calcular a probabilidade de o modelo preferencial estar correto, usando o critério de informação de Akaike.

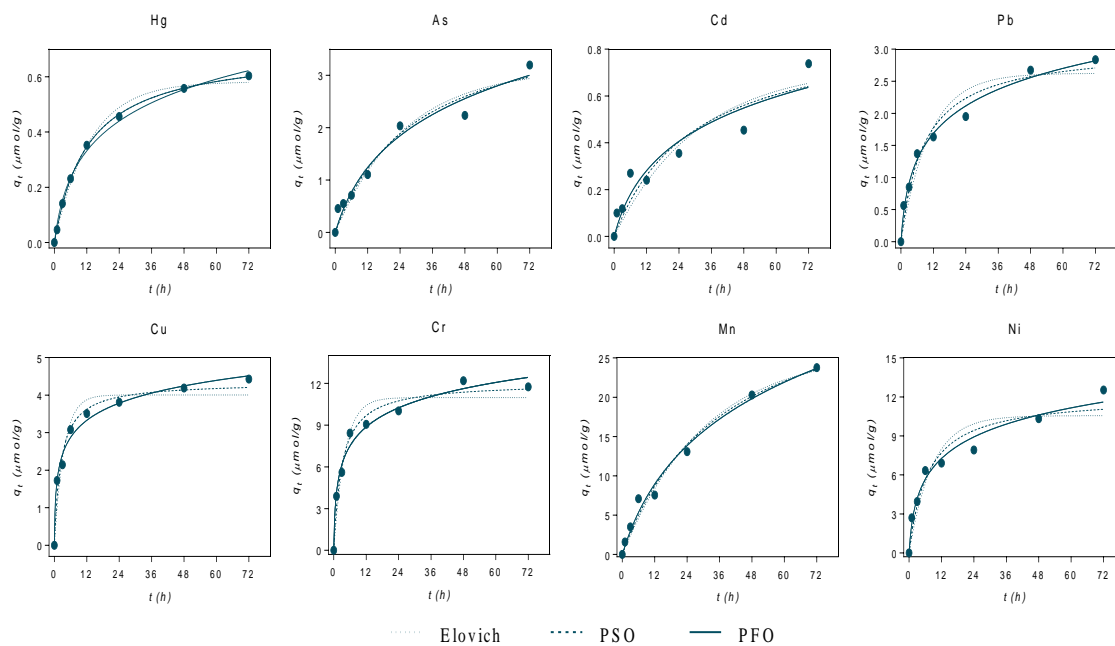


Figura 4.4: Ajuste dos modelos cinéticos aos dados experimentais obtidos para os contaminantes estudados, com uma massa de alga de 1,5 g/L.

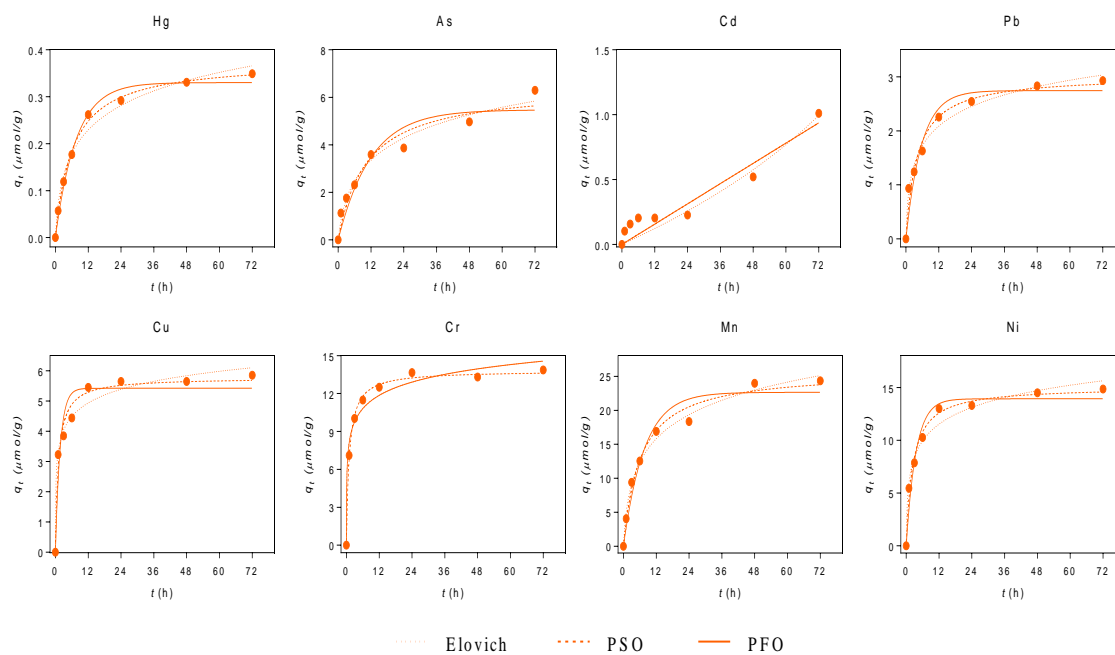


Figura 4.5: Ajuste dos modelos cinéticos aos dados experimentais obtidos para os contaminantes estudados, com uma massa de alga de 3,0 g/L.

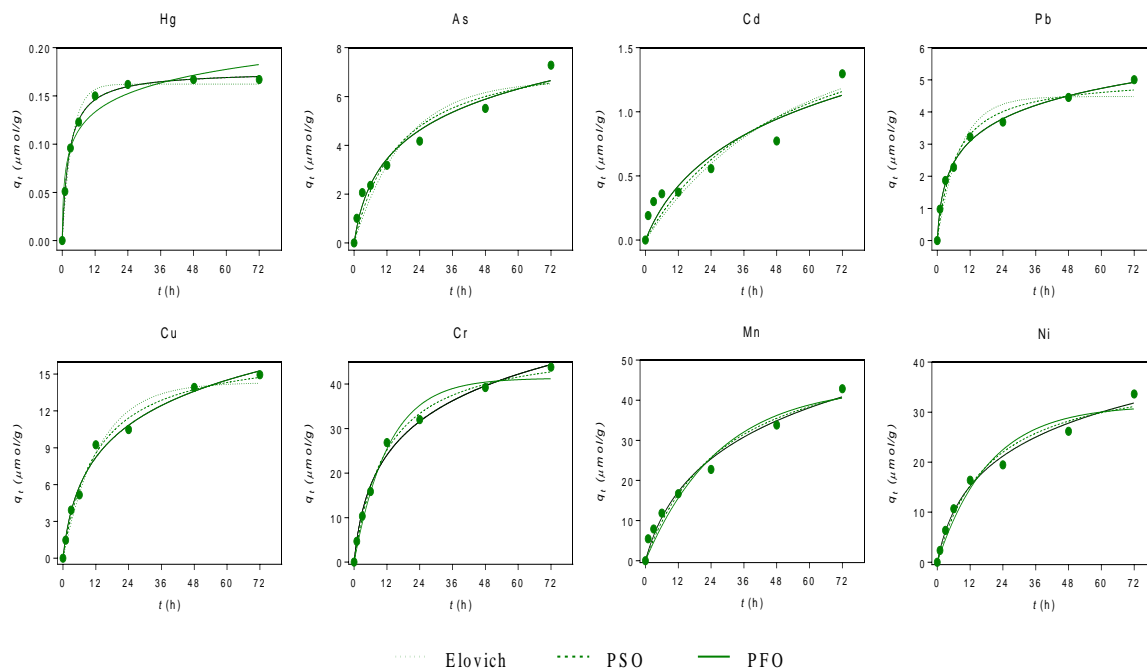


Figura 4.6: Ajuste dos modelos cinéticos aos dados experimentais obtidos para os contaminantes estudados, com uma massa de alga de 6,0 g/L.

Para 1,5 g/L de alga é possível verificar que, no caso do Hg, o modelo que aparenta ter melhor ajuste é o de PSO, uma vez que este é o que se aproxima mais dos dados experimentais (Figura 4.4). Com base nos valores apresentados na Tabela 4.4, e comparando com os outros modelos através do critério de informação de Akaike, conclui-se que, de fato o PSO é o que melhor se ajusta (probabilidade > 99%). Para o As e Cd, através da análise da Figura 4.4, verifica-se que nenhum modelo parece conseguir um bom ajuste aos dados experimentais, o que se comprova pelos baixos valores de R^2 (entre 0,864 e 0,978). Através do critério de informação de Akaike, verifica-se que o modelo com a maior probabilidade de estar correto é o de Elovich, tanto para o As como para o Cd (65 e 70%, respetivamente). Para o Pb, analisando a Figura 4.4, todos os modelos parecem adequar-se aos dados experimentais, embora nos últimos pontos o modelo que apresenta a maior aproximação é o de PFO. A análise estatística indica que ao longo de todo o período de ensaio, o modelo que mais se adequa é o de Elovich, com uma probabilidade de estar correto de 99%. Relativamente ao Cu, com uma probabilidade de 96%, o modelo mais correto é o de Elovich, apesar de todos revelarem um bom ajuste (nos pontos intermédios o que parece adaptar-se melhor é o de PSO, e no final o de PFO). No que diz respeito ao Cr, através da Figura 4.4, constata-se que no início todos os modelos se ajustam corretamente,

sendo posteriormente difícil distinguir qual o melhor. No entanto, o modelo Elovich é o que apresenta um R^2 superior, 0,9828. No caso do Mn, com uma probabilidade de 72%, o melhor ajuste é o obtido pelo modelo de Elovich, o mesmo que consegue o melhor ajuste para o Ni, segundo o critério de informação de Akaike (probabilidade de 98%).

Tabela 4.4: Resultados da modelação cinética, para massas de alga de 1,5, 3,0 e 6,0 g/L para os contaminantes estudados.

	Dose de alga (g/L)	PFO	PSO	Elovich	Modelo preferencial ^{a)}
Hg	1,5	$k_1: 0,076 \pm 0,006$ $q_e: 0,582 \pm 0,015$ $R^2: 0,993$ $S_{y,x}: 0,021$	$k_2: 0,116 \pm 0,005$ $q_e: 0,703 \pm 0,007$ $R^2: 0,999$ $S_{y,x}: 0,005$	$\alpha: 0,083 \pm 0,009$ $\beta: 5,71 \pm 0,345$ $R^2: 0,995$ $S_{y,x}: 0,017$	PSO <i>Probabilidade:</i> > 99%
	3,0	$k_1: 0,132 \pm 0,013$ $q_e: 0,330 \pm 0,009$ $R^2: 0,989$ $S_{y,x}: 0,015$	$k_2: 0,425 \pm 0,037$ $q_e: 0,377 \pm 0,007$ $R^2: 0,997$ $S_{y,x}: 0,008$	$\alpha: 0,115 \pm 0,028$ $\beta: 12,78 \pm 1,20$ $R^2: 0,984$ $S_{y,x}: 0,018$	PSO <i>Probabilidade:</i> >99%
	6,0	$k_1: 0,281 \pm 0,028$ $q_e: 0,162 \pm 0,004$ $R^2: 0,988$ $S_{y,x}: 0,072$	$k_2: 2,320 \pm 0,124$ $q_e: 0,176 \pm 0,002$ $R^2: 0,999$ $S_{y,x}: 0,002$	$\alpha: 0,288 \pm 0,161$ $\beta: 36,2 \pm 4,95$ $R^2: 0,964$ $S_{y,x}: 0,013$	PSO <i>Probabilidade:</i> >99%
As	1,5	$k_1: 0,04 \pm 0,01$ $q_e: 3,13 \pm 0,41$ $R^2: 0,950$ $S_{y,x}: 0,263$	$k_2: 0,008 \pm 0,004$ $q_e: 4,26 \pm 0,68$ $R^2: 0,959$ $S_{y,x}: 0,239$	$\alpha: 0,182 \pm 0,054$ $\beta: 0,811 \pm 0,243$ $R^2: 0,965$ $S_{y,x}: 0,221$	Elovich <i>Probabilidade:</i> 65%
	3,0	$k_1: 0,08 \pm 0,02$ $q_e: 5,50 \pm 0,59$ $R^2: 0,919$ $S_{y,x}: 0,637$	$k_2: 0,015 \pm 0,006$ $q_e: 6,44 \pm 0,62$ $R^2: 0,954$ $S_{y,x}: 0,481$	$\alpha: 1,1 \pm 0,3$ $\beta: 0,691 \pm 0,083$ $R^2: 0,978$ $S_{y,x}: 0,331$	Elovich <i>Probabilidade:</i> 95%
	6,0	$k_1: 0,055 \pm 0,021$ $q_e: 6,74 \pm 0,72$ $R^2: 0,918$ $S_{y,x}: 0,741$	$k_2: 0,007 \pm 0,003$ $q_e: 8,07 \pm 0,981$ $R^2: 0,945$ $S_{y,x}: 0,606$	$\alpha: 0,86 \pm 0,22$ $\beta: 0,514 \pm 0,087$ $R^2: 0,969$ $S_{y,x}: 0,449$	Elovich <i>Probabilidade:</i> 92%
Cd	1,5	$k_1: 0,033 \pm 0,027$ $q_e: 0,785 \pm 0,233$ $R^2: 0,868$ $S_{y,x}: 0,092$	$k_2: 0,031 \pm 0,036$ $q_e: 0,921 \pm 0,210$ $R^2: 0,887$ $S_{y,x}: 0,085$	$\alpha: 0,042 \pm 0,021$ $\beta: 4,10 \pm 1,47$ $R^2: 0,908$ $S_{y,x}: 0,077$	Elovich <i>Probabilidade:</i> 70%
	3,0	$k_1: 1,32 \times 10^{-5} \pm 0,013$ $q_e: 967 \pm 7,53 \times 10^6$ $R^2: 0,912$ $S_{y,x}: 0,103$	$k_2: 1,45 \times 10^{-8} \pm 1,01 \times 10^{-5}$ $q_e: 959 \pm 3,70 \times 10^6$ $R^2: 0,912$ $S_{y,x}: 0,103$	$\alpha: 0,009 \pm 0,003$ $\beta: -0,76 \pm 0,72$ $R^2: 0,922$ $S_{y,x}: 0,097$	Elovich <i>Probabilidade:</i> -
	6,0	$k_1: 0,02 \pm 0,01$ $q_e: 1,54 \pm 0,61$ $R^2: 0,864$ $S_{y,x}: 0,160$	$k_2: 0,009 \pm 0,01$ $q_e: 2,01 \pm 0,82$ $R^2: 0,873$ $S_{y,x}: 0,154$	$\alpha: 0,05 \pm 0,02$ $\beta: 1,81 \pm 0,85$ $R^2: 0,888$ $S_{y,x}: 0,145$	Elovich <i>Probabilidade:</i> 62%
Pb	1,5	$k_1: 0,09 \pm 0,02$ $q_e: 2,63 \pm 0,22$ $R^2: 0,937$ $S_{y,x}: 0,269$	$k_2: 0,04 \pm 0,01$ $q_e: 3,012 \pm 0,2$ $R^2: 0,971$ $S_{y,x}: 0,184$	$\alpha: 0,72 \pm 0,14$ $\beta: 1,54 \pm 0,16$ $R^2: 0,990$ $S_{y,x}: 0,106$	Elovich <i>Probabilidade:</i> 99%
	3,0	$k_1: 0,18 \pm 0,03$ $q_e: 2,73 \pm 0,11$	$k_2: 0,008 \pm 0,002$ $q_e: 3,03 \pm 0,14$	$\alpha: 2,21 \pm 0,54$ $\beta: 1,88 \pm 0,19$	Elovich

		R ² : 0,949 S _{y,x} : 0,249	R ² : 0,979 S _{y,x} : 0,160	R ² : 0,989 S _{y,x} : 0,116	Probabilidade: 93%
	6,0	k ₁ : 0,12 ± 0,03 q _e : 4,51 ± 0,36 R ² : 0,947 S _{y,x} : 0,428	k ₂ : 0,029 ± 0,006 q _e : 5,19 ± 0,25 R ² : 0,980 S _{y,x} : 0,261	α: 1,51 ± 0,22 β: 0,954 ± 0,04 R ² : 0,997 S _{y,x} : 0,102	Elovich Probabilidade: >99%
Cu	1,5	k ₁ : 0,28 ± 0,06 q _e : 4,01 ± 0,23 R ² : 0,937 S _{y,x} : 0,405	k ₂ : 0,09 ± 0,02 q _e : 4,33 ± 0,25 R ² : 0,977 S _{y,x} : 0,244	α: 8,37 ± 2,61 β: 1,51 ± 0,18 R ² : 0,989 S _{y,x} : 0,166	Elovich Probabilidade: 96%
	3,0	k ₁ : 0,61 ± 0,27 q _e : 5,40 ± 0,31 R ² : 0,9246 S _{y,x} : 0,5845	k ₂ : 0,16 ± 0,04 q _e : 5,82 ± 0,25 R ² : 0,977 S _{y,x} : 0,325	α: 107,9 ± 83,99 β: 1,51 ± 0,24 R ² : 0,982 S _{y,x} : 0,282	Elovich Probabilidade: 76%
	6,0	k ₁ : 0,08 ± 0,01 q _e : 14,3 ± 0,71 R ² : 0,979 S _{y,x} : 0,865	k ₂ : 0,005 ± 0,008 q _e : 17,2 ± 0,84 R ² : 0,991 S _{y,x} : 0,585	α: 2,13 ± 0,35 β: 0,24 ± 0,02 R ² : 0,991 S _{y,x} : 0,568	Elovich Probabilidade: 56%
Cr	1,5	k ₁ : 0,25 ± 0,05 q _e : 10,9 ± 0,61 R ² : 0,943 S _{y,x} : 1,083	k ₂ : 0,02 ± 0,06 q _e : 12,1 ± 0,52 R ² : 0,978 S _{y,x} : 0,669	α: 13,9 ± 4,81 β: 0,50 ± 0,05 R ² : 0,983 S _{y,x} : 0,592	Elovich Probabilidade: -
	3,0	k ₁ : 0,62 ± 0,14 q _e : 12,9 ± 0,42 R ² : 0,968 S _{y,x} : 0,916	k ₂ : 0,07 ± 0,06 q _e : 13,8 ± 0,24 R ² : 0,996 S _{y,x} : 0,307	α: 321 ± 297 β: 0,661 ± 0,09 R ² : 0,978 S _{y,x} : 0,755	Elovich Probabilidade: -
	6,0	k ₁ : 0,79 ± 0,019 q _e : 41,3 ± 1,6 R ² : 0,986 S _{y,x} : 2,05	k ₂ : 0,017 ± 0,002 q _e : 49,7 ± 1,512 R ² : 0,996 S _{y,x} : 1,16	α: 6,31 ± 0,83 β: 0,08 ± 0,06 R ² : 0,994 S _{y,x} : 1,39	Elovich Probabilidade: -
Mn	1,5	k ₁ : 0,03 ± 0,06 q _e : 25,9 ± 2,24 R ² : 0,982 S _{y,x} : 1,28	k ₂ : 0,08 ± 0,02 q _e : 35,7 ± 3,95 R ² : 0,985 S _{y,x} : 1,15	α: 1,13 ± 0,22 β: 0,09 ± 0,01 R ² : 0,988 S _{y,x} : 1,02	Elovich Probabilidade: 72%
	3,0	k ₁ : 0,13 ± 0,02 q _e : 22,6 ± 1,22 R ² : 0,959 S _{y,x} : 1,94	k ₂ : 0,06 ± 0,01 q _e : 25,8 ± 1,02 R ² : 0,986 S _{y,x} : 1,12	α: 8,21 ± 1,52 β: 0,19 ± 0,01 R ² : 0,991 S _{y,x} : 0,888	Elovich Probabilidade: -
	6,0	k ₁ : 0,03 ± 0,09 q _e : 43,6 ± 4,53 R ² : 0,963 S _{y,x} : 3,07	k ₂ : 0,06 ± 0,02 q _e : 57,2 ± 6,91 R ² : 0,973 S _{y,x} : 2,60	α: 2,51 ± 0,52 β: 0,06 ± 0,09 R ² : 0,983 S _{y,x} : 2,08	Elovich Probabilidade: -
Ni	1,5	k ₁ : 0,12 ± 0,04 q _e : 10,6 ± 0,92 R ² : 0,887 S _{y,x} : 1,47	k ₂ : 0,01 ± 0,05 q _e : 12,1 ± 1,13 R ² : 0,939 S _{y,x} : 1,08	α: 3,65 ± 1,13 β: 0,401 ± 0,05 R ² : 0,976 S _{y,x} : 0,679	Elovich Probabilidade: 98%
	3,0	k ₁ : 0,28 ± 0,05 q _e : 13,9 ± 0,64 R ² : 0,963 S _{y,x} : 1,09	k ₂ : 0,028 ± 0,004 q _e : 15,1 ± 0,44 R ² : 0,989 S _{y,x} : 0,577	α: 28,4 ± 11,7 β: 0,43 ± 0,04 R ² : 0,982 S _{y,x} : 0,764	Elovich Probabilidade: -
	6,0	k ₁ : 0,05 ± 0,01 q _e : 31,2 ± 2,53 R ² : 0,962 S _{y,x} : 2,48	k ₂ : 0,13 ± 0,04 q _e : 39,3 ± 3,34 R ² : 0,979 S _{y,x} : 1,86	α: 2,82 ± 0,51 β: 0,09 ± 0,01 R ² : 0,989 S _{y,x} : 1,34	Elovich Probabilidade: -

a) Probabilidade calculada através do GraphPad Prism 6[®] após a comparação dos modelos através do critério de informação de Akaike

Para todos os elementos, observa-se que o modelo que melhor explica a sorção do contaminante pela alga, quando se utiliza uma massa de 1,5 g/L, é o mesmo que consegue os melhores ajustes aos dados experimentais obtidos com 3,0 e 6,0 g/L (Figura 4.5 e Figura 4.6). Estes resultados confirmam que o mecanismo de remoção não será dependente da massa de sorvente utilizada, mas dos processos de interação dos elementos com a parede celular das macroalgas. Em geral, o modelo que piores ajustes aos dados experimentais conseguiu foi o de PFO, o que é corroborado pelos valores de R^2 mais baixos (0,864 - 0,992) e os valores mais altos de $S_{y.x}$ (0,015 - 3,07). Isto pode ser indicativo de que há mais do que um mecanismo de sorção envolvido no processo de remoção dos contaminantes inorgânicos (Henriques et al. 2015). Por outro lado, com exceção do Hg, cujos dados experimentais foram melhor ajustados pelo modelo de PSO, o modelo que melhor se adapta aos dados experimentais é o de Elovich. Pode-se assim concluir que o passo determinante na sorção dos contaminantes inorgânicos estudados é a quimiosorção, isto é, a interação química entre os íons e os grupos funcionais que se encontram à superfície da alga. Este processo envolve complexação, coordenação e/ou quelatação, em vez de apenas sorção física (Henriques et al., 2015).

Os valores obtidos para o k (parâmetro relacionado com a extensão e velocidade do processo) – Tabela 4.4, reforçam as conclusões anteriores, uma vez que os seus valores aumentam com o incremento da massa de alga utilizada.

Na literatura há escassez de estudos sobre a bioacumulação de metais que incluam a modelação cinética. Um dos trabalhos disponíveis é o de Vasconcelos & Leal (2001) sobre a acumulação de Cu, Pb, Cd e Hg pelas macroalgas *Porphyra spp.* e *Enteromorpha spp.* Os autores assumiram que o modelo que se ajustava melhor aos dados experimentais era o PFO e identificaram três segmentos lineares nas curvas de modelação que corresponderiam a diferentes taxas de sorção. Também Henriques et al. (2015) realizaram a modelação cinética dos seus resultados, num trabalho em que estudaram a capacidade da alga *Ulva lactuca* para acumular Hg de águas salinas e concluíram que os modelos que melhor se adequaram aos dados experimentais foram os de PSO e de Elovich, corroborando os dados obtidos no presente estudo. Figueira et al. (2016) também incluíram a modelação cinética na sua investigação, e compararam a remoção de Hg, Cd e Pb em sistemas monometálicos e multimetálicos. Verificaram que nas soluções monometálicas de Hg, o modelo de Elovich é o único capaz de ajustar os dados e que nas soluções monometálicas de Pb, o

modelo que se ajustou melhor aos dados experimentais foi o PSO, concluindo assim que as interações metal-macroalga dependem da natureza do elemento. Relativamente às soluções multimetálicas, o modelo de Elovich conseguiu descrever bem as cinéticas de sorção para o Hg, enquanto que para os dados do Pb vários modelos se ajustaram.

4.6. Concentração de contaminantes na macroalga

Na Figura 4.7 é feita a comparação entre a quantidade de contaminante sorvida pela *U. lactuca*, prevista com base no balanço de massas ($q_{f_{teor}}$), e a obtida experimentalmente ($q_{f_{exp}}$) para 1,5 g/L, 3,0 g/L e 6,0 g/L de alga.

De um modo global, pode dizer-se que a quantidade de contaminante removido das soluções foi fixada pelas algas, uma vez que as concentrações encontradas na sua biomassa são da ordem de grandeza das previstas pelo balanço de massas.

É possível concluir também que, a quantidade de contaminante fixado na alga ($q_{f_{exp}}$) segue a seguinte sequência: Mn > Pb > Ni > As > Cr > Cu > Cd > Hg para 1,5 g/L de alga; Mn > Ni > Pb > Cr > As > Cu > Cd > Hg para 3,0 g/L e Mn > Ni > Cr > Pb > Cu > As > Cd > Hg para 6,0 g/L de alga. O elemento em maior quantidade na alga é o Mn e o que se encontra em menor quantidade é o Hg, apesar de ter sido o metal com maior percentagem de remoção. Figueira et al. (2016) estudaram a capacidade de bio-sorção de duas macroalgas em águas salinas, para soluções mono e multimetálicas, concluindo que, no que diz respeito à quantidade de metal sorvido na alga a sequência era: Pb >> Hg > Cd, para concentrações iniciais dos metais iguais às utilizadas neste trabalho. Estes resultados não estão de acordo com os do presente estudo na medida em que a quantidade de Cd sorvido foi superior à de Hg, em todas as situações. É possível também constatar que foram obtidas maiores concentrações de metal na biomassa da *U. lactuca* no presente estudo, do que as obtidas na experiência de Figueira et al. (2016). Os autores obtiveram concentrações de 0,558 $\mu\text{mol/g}$ para o Hg, de 0,107 $\mu\text{mol/g}$ para o Cd, e de 2,531 $\mu\text{mol/g}$ para o Pb, e neste trabalho obtiveram-se 0,604 $\mu\text{mol/g}$ de Hg, 1,504 $\mu\text{mol/g}$ de Cd, e 5,496 $\mu\text{mol/g}$ de Pb. Contudo, as massas de biomassa usadas foram diferentes (0,5 g/L em Figueira et al. (2016) vs 0,379 g/L neste estudo, valores em peso seco) e os ensaios foram realizados com diferente número de contaminantes (3 contaminantes em Figueira et al. (2016) vs 8 contaminantes neste estudo). Além disso, aqui usou-se a macroalga viva, enquanto o referido estudo se focou na aplicação de resíduos secos de biomassa.

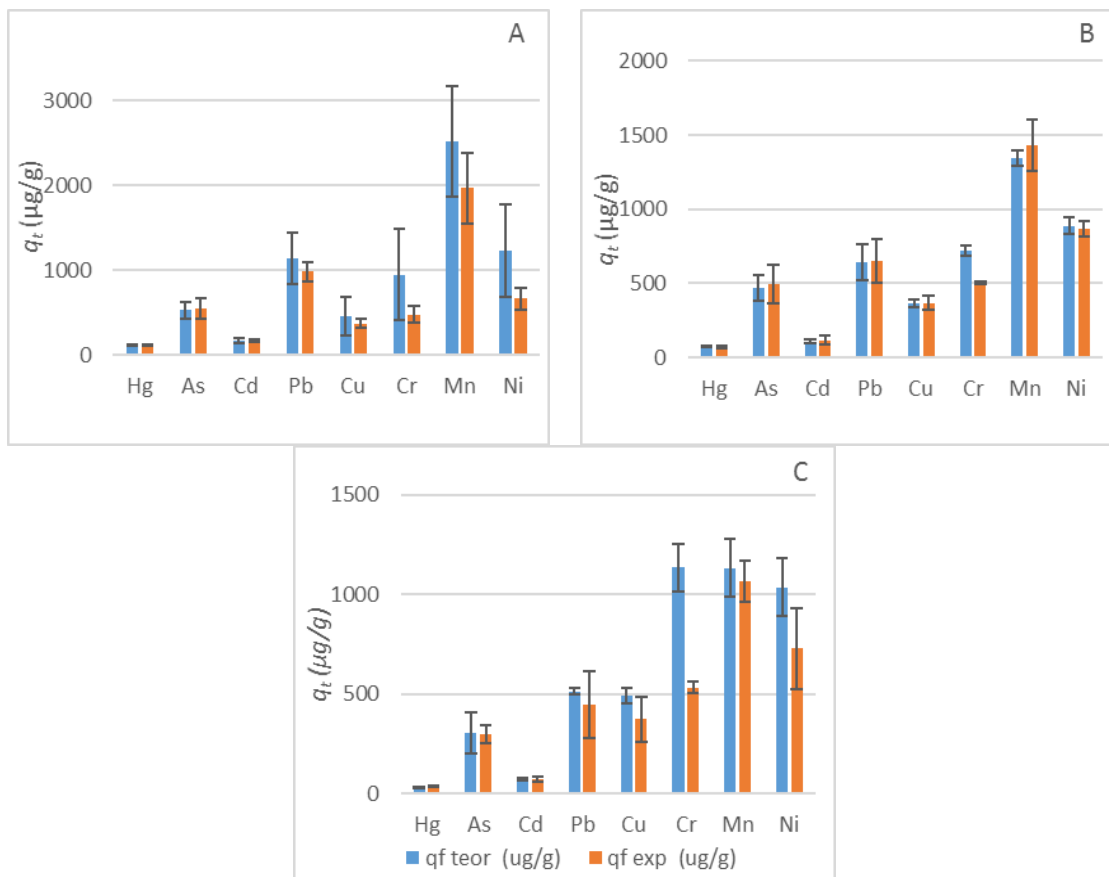


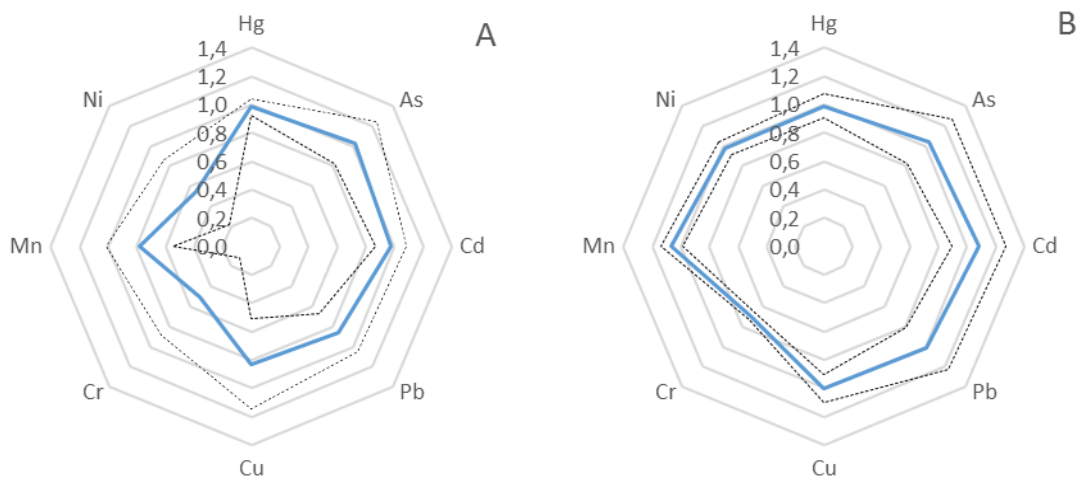
Figura 4.7: Concentração de contaminante ($\mu\text{g/g}$) na biomassa da macroalga após contato com água salina contaminada, para as massas de macroalga de: A – 1,5 g/L; B – 3,0 g/L e C – 6,0 g/L. São apresentados os dados estimados e os obtidos experimentalmente (valores médios). Barras de erro correspondem ao desvio padrão de 3 réplicas no caso de $q_f \text{ teor}$ e de 6 réplicas no caso de $q_f \text{ exp}$.

Na literatura encontram-se estudos que referem que diferentes metais têm afinidades diferentes para as biomassas de alga. Um exemplo são as experiências realizadas por Romera et al. (2007), em que os autores observaram que o Pb tinha maior afinidade para as algas do que o Cd. Os autores colocaram a hipótese de a diferente afinidade dos metais se relacionar com as propriedades intrínsecas do elemento, tais como os raios iônicos e a eletronegatividade dos átomos. Brady & Tobin (1995) verificaram que a capacidade de remoção dos metais pela biomassa, *Rhizopus arrhizus*, estava relacionada com o índice de covalência dos íons metálicos, ou seja, quanto maior era o valor do índice de covalência do íon metálico, maior era o seu potencial para formar ligações covalentes com ligandos biológicos.

De todos os elementos em estudo (Figura 4.7), o Cr é aquele que apresentou as maiores discrepâncias entre os valores teóricos e os experimentais, para a quantidade de

metal sorvido pelas algas para 3,0 e 6,0 g/L. Para 1,5 g/L, obtiveram-se boas concordâncias para todos os elementos em estudo, com exceção do Ni, enquanto que para 3,0 g/L, os valores de q_t , estimados e obtidos para o As, Cd, Pb e Mn não diferem de forma relevante. Para Hg, As e o Cd obtiveram-se resultados concordantes para a massa de alga de 6,0 g/L, sendo que para todos os outros existiram diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estatísticos foram obtidos através do *unpaired t test, two-ways*, avaliando-se o valor de p , para um intervalo de confiança de 95%.

Na Figura 4.8 apresenta-se a razão entre os dados experimentais e os dados teóricos (qf_{exp}/qf_{teor}), para as diferentes biomassas de alga estudadas. Uma boa concordância entre os valores estimados e os obtidos corresponde a uma razão próxima de 1. Assim, a análise do gráfico A, da Figura 4.8 permite confirmar que os contaminantes inorgânicos que obtiveram piores correlações entre valores estimados e obtidos foram o Ni ($0,5 \pm 0,3$), o Mn ($0,8 \pm 0,2$), o Cr ($0,5 \pm 0,4$) e o Cu ($0,8 \pm 0,3$), para a massa de alga de 1,5 g/L. Os resultados mais concordantes foram os obtidos com 3,0 g/L, onde se verifica uma boa correlação para todos os contaminantes, à exceção do Cr ($0,7 \pm 0,03$). Já para 6,0 g/L de alga, os contaminantes com piores correlações são o Ni ($0,7 \pm 0,2$), o Cr ($0,5 \pm 0,1$) e o Cu ($0,8 \pm 0,2$). De um modo geral, podemos reafirmar que o metal com pior correlação é o Cr e que, os contaminantes com melhores correlações são o Hg, o As e o Cd.



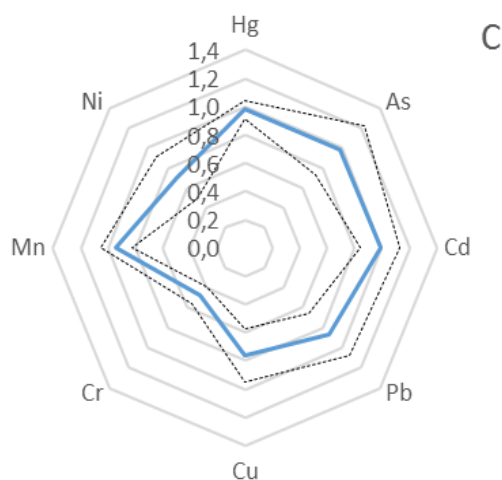


Figura 4.8: Razão entre os valores de q_f previsto e q_f obtido, para os diferentes elementos e massas de alga de: A – 1,5 g/L, B – 3 g/L e C – 6 g/L (as razões são apresentadas a azul e a tracejado apresentam-se os valores dos desvios padrão).

4.7. Avaliação da fração de contaminante ligado extracelularmente

Os resultados anteriores permitiram comprovar que os metais/metaloídes removidos da solução se encontram maioritariamente na biomassa das macroalgas, no entanto, nada se pode concluir acerca da sua localização preferencial, isto é, se os contaminantes se encontrarão ligados mais superficialmente ou acumulados no interior das algas. Com o intuito de esclarecer a questão da partição celular dos contaminantes, foram realizadas “lavagens” dos discos de algas, recolhidos no fim dos ensaios de biorremocão, e posteriormente quantificou-se o conteúdo dos contaminantes nos extratos. Foram usadas como soluções extractantes: água ultrapura e três concentrações de EDTA.

Na Figura 4.9 encontram-se as percentagens de contaminante inorgânico ligado extracelularmente (% de contaminante extracelular), estimadas através da quantificação dos extratos, após a lavagem dos discos da macroalga com água e três concentrações de EDTA (0.001, 0.01 e 0.1 M), de acordo com:

$$\% \text{ contaminante extracelular} = \frac{(C_{ext} \times V_{ext})}{(q_f \times m)} \times 100 \quad (6)$$

em que C_{ext} e V_{ext} são, respetivamente, a concentração de contaminante no extrato e o volume de extrato, q_f é a concentração de contaminante na alga antes da lavagem com solução extratante e m a massa da alga utilizada.

De um modo geral, observa-se que um aumento da concentração das soluções de EDTA leva a um aumento da percentagem de contaminante extraído. As soluções de EDTA mais concentradas seriam, presumivelmente, mais eficazes na extração uma vez que uma maior concentração de EDTA significa uma maior quantidade de grupos quelantes presentes em solução para ligar os contaminantes. No entanto, para o Cd verifica-se um comportamento oposto, ou seja, a concentração de EDTA mais diluída é a que extrai mais Cd, não se tendo encontrado explicação para tal comportamento. Para o Ni, verifica-se que a solução de EDTA 0,01M é a que leva a uma maior extração deste metal, seguida da solução de EDTA 0,1M, e por fim a solução de EDTA 0,001M.

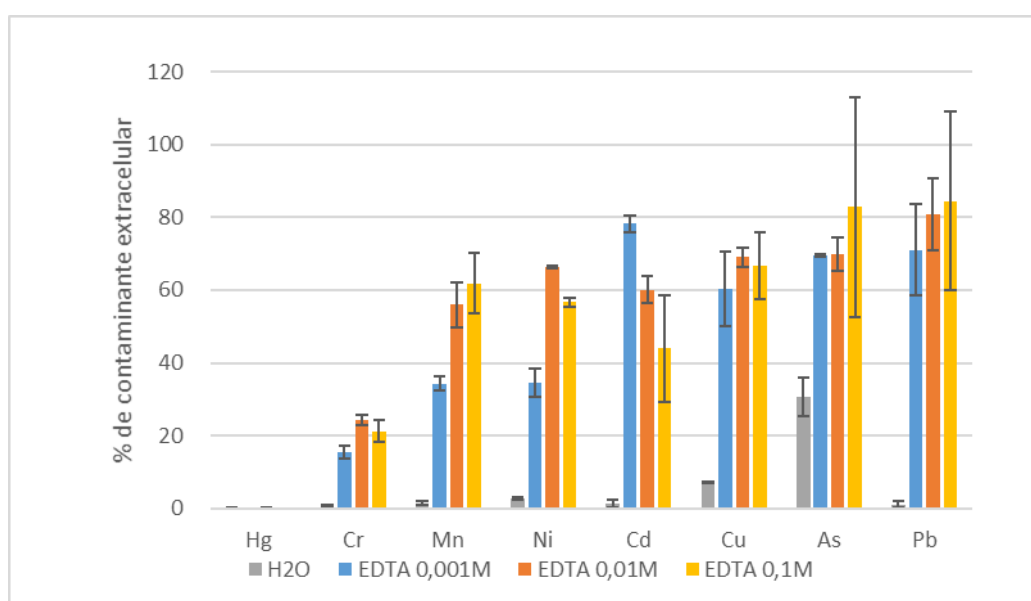


Figura 4.9: Percentagem de contaminante extracelular, de acordo com a quantificação dos extratos, após lavagem das algas com soluções de água ultrapura e EDTA com concentrações 0,001, 0,01 e 0,1 M. Dados correspondem a valores médios de 4 réplicas, sendo as barras de erro o desvio padrão.

De acordo com a Figura 4.9, cerca de 16 a 21% do Cr na macroalga estará ligado à superfície. Por outro lado, entre 22 a 56% de Cd, 15 a 29% de Pb, 34 a 65% de Ni, e 38 a 66% de Mn estarão ligados mais internamente. O Hg está praticamente ausente da superfície das macroalgas. O As e o Pb foram os elementos que maioritariamente se encontraram na superfície (cerca de 80%). Assim, o Hg e o Cr encontram-se maioritariamente no interior das macroalgas, sendo que todos os outros elementos se encontrarão parcialmente sorvidos à superfície.

Como já foi referido anteriormente, a metodologia utilizada para a partição dos contaminantes na biomassa da alga não está definida e otimizada, e como tal, não há a

certeza absoluta de que tudo o que é extraído pelo EDTA se encontra apenas sorvido superficialmente. Não se sabe se as soluções de EDTA, nas concentrações utilizadas, provocam a ruptura parcial ou total da parede celular o que poderia levar à libertação, e consequente extração, dos contaminantes que se encontram também no interior da alga. No entanto, há autores que defendem que uma forma de verificar a integridade da parede celular durante as extrações, é analisar a concentração de K nos extratos, visto que este elemento se encontra localizado sobretudo internamente (Pérez-Llamazares et al., 2010).

Na Tabela 4.5 encontram-se as concentrações de K presentes extratos usados para avaliação da partição dos contaminantes na alga.

Tabela 4.5: Concentrações de potássio ($\mu\text{g/L}$) nas soluções extratantes.

Solução de lavagem	Concentração de potássio ($\mu\text{g/L}$)
Referência	≈ 10
H₂O ultrapura	17565
EDTA 0,001M	16440
EDTA 0,01M	32857
EDTA 0,1M	35475

Verifica-se que as concentrações de K nos extratos de água ultrapura e de EDTA 0,001M são próximas, e da ordem dos 17 mg/L , e que um aumento da concentração de EDTA em 10 e 100 vezes leva a que a concentração de K em solução duplique. Estes resultados não permitem obter conclusões claras acerca da integridade da membrana, isto é, se e em que situações ocorreu rompimento da membrana celular. Porém, como a concentração inicial de K nas soluções extratantes eram cerca de 180 $\mu\text{g/L}$, admite-se que poderá ter existido danificação da membrana celular.

Além da quantificação dos contaminantes inorgânicos nos extratos, determinaram-se também as suas concentrações nas algas, após a sua lavagem com as soluções extratantes, e calcularam-se as percentagens de contaminante extracelular, de acordo com:

$$\% \text{ contaminante extracelular real} = \frac{(q_f \times m) - (q_{f_{ext}} \times m)}{(q_f \times m)} \times 100 \quad (7)$$

em que $q_{f_{ext}}$ é a concentração de contaminante na alga após contato com solução extratante.

Na Figura 4.10, encontram-se representados os resultados obtidos, verificando-se que a água ultrapura extraiu uma quantidade considerável de alguns elementos, nomeadamente, de As, Cd, Cu e Ni. No entanto, o seu poder extratante é menor do que o das soluções de EDTA, não sendo capaz de extrair Hg, Pb e Mn. Com base nestes resultados, constata-se que para todos os elementos, o aumento da concentração de EDTA levou a um aumento da percentagem de contaminante extraído.

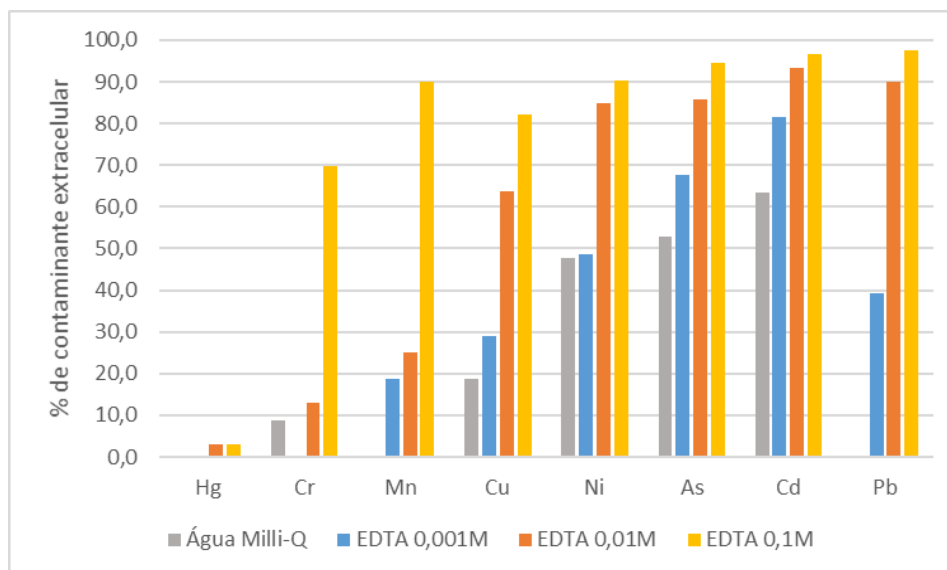


Figura 4.10: Percentagem de contaminante extracelular, de acordo com a sua concentração na biomassa, após lavagem das algas com soluções de água ultrapura e EDTA com concentrações 0,001, 0,01 e 0,1 M. Dados correspondem a valores médios de 4 réplicas, sendo as barras de erro o desvio padrão.

Para o Hg verifica-se que este não é extraído com nenhuma das soluções estudadas, corroborando os resultados anteriores. Para os restantes contaminantes inorgânicos a avaliação com solução de EDTA mais concentrada (0,1 M), indica que estes estarão maioritariamente na superfície da alga. Ao analisar os resultados obtidos com a solução de EDTA 0,001M (solução menos concentrada), constata-se que apenas Ni, As, Cd e o Pb estarão em grande parte na superfície.

Para averiguar a integridade da parede celular, analisou-se o conteúdo de K existente nas algas, antes e após contacto com as soluções extratantes, cujos resultados se encontram na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Concentrações de potássio ($\mu\text{g/g}$) nas algas antes e após lavagem com água ultrapura, e com soluções de EDTA 0,001M, 0,01M e 0,1M.

Solução de lavagem	Concentração de potássio (µg/g)
Referência (antes lavagem)	20837
H₂O Ultrapura	3757
EDTA 0,001M	15561
EDTA 0,01M	6073
EDTA 0,1M	2860

As concentrações de K nas algas, após contato com as soluções extratantes, é menor do que a concentração inicial na alga. A solução que removeu uma menor quantidade de K foi a solução de EDTA 0,001M, o que indica que esta solução não terá danificado de forma relevante a membrana celular das algas.

Deste modo, podemos dizer que a solução que produzirá resultados mais fidedignos na avaliação da partição dos contaminantes nas algas será a solução de EDTA 0,001M, visto não ter alterado a integridade da membrana celular. Utilizando esta solução foi possível separar claramente um grupo de contaminantes que ficarão maioritariamente sorvidos na superfície da alga (Ni, As, Cd e o Pb) daqueles que estarão principalmente bioacumulados (Hg e Cr). Estes resultados constituem uma informação nova, uma vez que na literatura não foram encontradas referências a este aspecto.

Uma vez que o meio, principalmente a zona próxima da superfície da macroalga é rica em O₂, libertado aquando da fotossíntese, existe a probabilidade de formação de óxidos de ferro e manganês, e de parte dos contaminantes em solução se associarem a eles. De modo a investigar esta situação, foram analisadas as correlações entre as concentrações dos contaminantes nos extratos de EDTA (normalizadas para a concentração em água ultrapura) e as concentrações normalizadas nos extratos de Mn e de Fe. Os resultados obtidos podem observar-se na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Correlação entre as concentrações dos contaminantes e a concentração de manganês, e de ferro nos extratos de EDTA (grau de confiança de 95%).

Elemento	Mn	Fe
Hg	R²: 0,033	R²: 0,42
As	R²: 0,69	R²: 0,96
Cd	R²: 0,62	R²: 0,088
Pb	R²: 0,94	R²: 0,43
Cu	R²: 0,97	R²: 0,66
Cr	R²: 0,99	R²: 0,59
Ni	R²: 0,98	R²: 0,52

Relativamente ao Hg verifica-se que este metal não se correlaciona significativamente nem com o Mn nem com o Fe. Este facto apoia as conclusões anteriores de que o Hg se encontra predominantemente no interior das algas ou ligado fortemente aos grupos funcionais da biomassa. No caso do As, verifica-se uma boa correlação com o ferro ($R^2=0,96$). Os resultados do Cd indicam que este metal, tal como o Hg, não se correlaciona nem com o Mn nem com o Fe, devendo encontrar-se diretamente ligado aos grupos funcionais da superfície da macroalga, uma vez que os resultados da partição celular indicam que este se encontraria preferencialmente na superfície da alga. Para o Pb ($R^2 = 0,94$), Cu ($R^2 = 0,97$), Cr ($R^2 = 0,99$) e Ni ($R^2 = 0,98$) verificou-se que estes elementos se correlacionam significativamente com o Mn, o que indica que a fração de metal ligado extracelularmente, se encontrará maioritariamente associado aos óxidos de Mn e não aos óxidos de Fe.

Resumindo, todos os contaminantes se correlacionam maioritariamente com o Mn, com exceção do Cd e do Hg, que não se correlacionam nem com o Mn nem com o Fe, e do As que se correlaciona com o Ferro. De referir que nas soluções contaminadas estudadas havia maior quantidade de Mn do que Fe, sendo a concentração de Mn cerca de 2 mg/L enquanto a de Fe era apenas 0,3 mg/L, existindo cerca de 6,6 vezes mais Mn que Fe em solução. Esta relação aproxima-se de uma situação real, uma vez que Warnken et al.,

(2001) indicam que nos interstícios próximos das macroalgas, existe cerca de 5 vezes mais Mn que Fe.

Conclusão

Tentando preencher uma lacuna existente na literatura, neste trabalho estudou-se a biorremediação de soluções salinas complexas, contendo simultaneamente 8 contaminantes inorgânicos relevantes (As, Cd, Pb, Cu, Cr, Hg, Mn e Ni), usando uma macroalga verde viva, *Ulva lactuca*, que além de muito abundante globalmente, tem demonstrado uma grande capacidade de bioissorção e bioacumulação.

Os resultados demonstraram que a salinidade do meio, numa gama 15-35, não tem influência na capacidade de biorremoção da alga. Pelo contrário, a quantidade de biomassa utilizada é relevante, tendo-se obtido maiores quantidades de contaminante removido quando se usou 6,0 g/L de alga (peso fresco). Para esta massa, as eficiências de remoção variaram entre 98% para o Hg e 48% para o As.

Relativamente à cinética, de um modo geral, o modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o de *Elovich*, com exceção do Hg, cuja bioissorção/bioacumulação ao longo do tempo foi melhor descrita pelo modelo de PSO.

A avaliação da partição celular dos contaminantes na alga, mostrou que a água ultrapura não foi eficiente na extração dos contaminantes, ao contrário das soluções de EDTA (com exceção do Hg). Para além disso, foi possível verificar que é preferível avaliar a partição dos contaminantes através de quantificação direta na biomassa da alga, após extração, do que através da análise quantitativa dos extratos. Conclui-se também que a solução que aparentemente manteve a integridade da membrana celular foi a solução de EDTA 0,001M, produzindo, por isso, resultados mais fidedignos sobre a associação dos contaminantes à alga. Usando a metodologia proposta (extração com EDTA 0,001 M), é possível verificar que o Hg se encontra predominantemente no interior da alga. O As, o Cd e o Ni encontram-se maioritariamente à superfície das algas, enquanto os restantes se encontram parcialmente à superfície. A análise das correlações dos contaminantes com o Mn e o Fe evidenciou que todos eles (com exceção do Hg, As e Cd) se relacionam melhor com o Mn, sugerindo uma associação entre estes elementos e os óxidos de Mn presumivelmente formados à superfície da macroalga.

Este trabalho constituiu apenas uma pequena parte de um estudo que deve ser continuado e aprofundado futuramente, para que a metodologia estudada se torne uma opção viável para a remoção de contaminantes inorgânicos de águas contaminadas. Os estudos deverão incidir sobre os mecanismos de ligação dos contaminantes às macroalgas,

visto que estes ainda não estão bem definidos. Misturas de contaminantes em igual concentração molar seria uma boa forma de definir e compreender a seletividade da *Ulva lactuca*. Teria também interesse inserir pesticidas ou outros compostos orgânicos nas misturas estudadas, de modo a que a aproximação à realidade verificada em águas naturais fosse maior.

5. Bibliografia

- [1] <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Meersalat-Ulva-lactuca.jpg> (consultado em 27 de outubro de 2015).
- Afkhami, A., Saber-Tehrani, M., Bagheri, H., 2010. Simultaneous removal of heavy-metal ions in wastewater samples using nano-alumina modified with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J. Hazard. Mater.* 181, 836–844.
- Ahluwalia, S.S., Goyal, D., 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresour. Technol.* 98, 2243–2257.
- Areco, M.M., Hanela, S., Duran, J., dos Santos, A.M., 2012. Biosorption of Cu(II), Zn(II), Cd(II) and Pb(II) by dead biomasses of green alga *Ulva lactuca* and the development of a sustainable matrix for adsorption implementation. *J. Hazard. Mater.* 213-214, 123–132.
- ATSDR, 2013. Priority List of Hazardous Substances. URL <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>. Consultado em 11 de novembro de 2015.
- Babel, S., Kurniawan, T.A., 2003. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review. *J. Hazard. Mater.* 97, 219–243.
- Ben-Ari, T., Neori, A., Ben-Ezra, D., Shauli, L., Odintsov, V., Shpigel, M., 2014. Management of *Ulva lactuca* as a biofilter of mariculture effluents in IMTA system. *Aquaculture* 434, 493–498.
- Boumans, P.W.J.M., 1987. Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy Part 2: Applications and Fundamentals. New York: John Wiley & Sons.
- Brady, J.M., Tobin, J.M., 1995. Binding of hard and soft metal ions to *Rhizopus arrhizus* biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 17, 791–796.
- Brinza, L., Nygård, C., Dring, M.J., Gavrilescu, M., Benning, L.G., 2009. Cadmium tolerance and adsorption by the marine brown alga *Fucus vesiculosus* from the Irish Sea and the Bothnian Sea. *Bioresour. Technol.* 100, 1727–33.
- Bruhn, A., Dahl, J., Nielsen, H.B., Nikolaisen, L., Rasmussen, M.B., Markager, S., Olesen, B., Arias, C., Jensen, P.D., 2011. Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: Biomass yield, methane production and combustion. *Bioresour. Technol.* 102, 2595–2604.
- Cai, Y., 2000. Atomic Fluorescence in Environmental Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*.
- Chen, B., Zou, D., Jiang, H., 2015. Elevated CO₂ exacerbates competition for growth and

- photosynthesis between *Gracilaria lemaneiformis* and *Ulva lactuca*. *Aquaculture* 443, 49–55.
- Chojnacka, K., 2010. Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. *Environ. Int.* 36, 299–307.
- Chojnacka, K., 2007. Bioaccumulation of Cr III ions by Blue Green Alga *Spirulina* sp. Part I. A Comparison with Biosorption. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 2, 218–223.
- Cobas, M., Sanromán, M., Pazos, M., 2014. Box–Behnken methodology for Cr (VI) and leather dyes removal by an eco-friendly biosorbent: *F. vesiculosus*. *Bioresour. Technol.* 160, 166–174.
- Costa, S., Crespo, D., Henriques, B.M.G., Pereira, E., Duarte, A.C., Pardal, M.A., 2011. Kinetics of mercury accumulation and its effects on *ulva lactuca* growth rate at two salinities and exposure conditions. *Water. Air. Soil Pollut.* 217, 689–699.
- Costas, R.C., López, J., 2001. Application of the sequential elution technique to determine Cd and Cu cellular location in *Ulva lactuca* Linnaeus. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 427–435.
- Costley, C.T., Mossop, K.F., Dean, J.R., Garden, L.M., Marshall, J., Carroll, J., 2000. Determination of mercury in environmental and biological samples using pyrolysis atomic absorption spectrometry with gold amalgamation. *Anal. Chim. Acta* 405, 179–183.
- Decisão n.º 2455/2001/CE, 2001. Decision No 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC. *Off. J. Eur. Union* 3–7.
- Decreto-Lei n.º 103/2010, 2010. Decreto-Lei n.º 103/2010 do Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território de 24 de Setembro sobre a redução da poluição. *Diário da República I Série* 4289–4296.
- Decreto-Lei n.º 236/98, 1998. Decreto-Lei n.º 236/98 do Ministério Português do Ambiente de 1 de Agosto, que estabelece normas de qualidade da água. *Diário da República I Série* 3676–3722.
- Demirbas, A., 2008. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: A review. *J. Hazard. Mater.* 157, 220–229.
- Desaunay, A., Martins, J.M.F., 2014. Comparison of chemical washing and physical cell-disruption approaches to assess the surface adsorption and internalization of cadmium

- by *Cupriavidus metallidurans* CH34. *J. Hazard. Mater.* 273, 231–238.
- Diretiva 2000/60/CE, 2000. Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro de 2000, que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água. *J. Of. das Comunidades Eur.*
- Diretiva 2006/11/CE, 2006. Directive 2006/11/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community. *Off. J. Eur. Union* 52–59.
- Diretiva 2008/105/CE, 2008. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86. *Off. J. Eur. Union* 84–97.
- Diretiva 2013/39/UE, 2013. Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de agosto de 2013 que altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água. *J. Of. da União Eur.* 1–17.
- El-Khaiary, M.I., Malash, G.F., 2011. Common data analysis errors in batch adsorption studies. *Hydrometallurgy* 105, 314–320.
- El-Naggar, M.E.E., AL-Amoudi, O.A., 1989. Heavy Metal Levels in Several Species of Marine Algae from the Red Sea of Saudi Arabia. *Atlantic I*, 5–13.
- Ewing, G.W., 1997. *Analytical Instrumentation Handbook, Analytical Instrumentation Handbook*. New York: Marcel Dekker.
- Farooq, U., Kozinski, J., Khan, M.A., Athar, M., 2010. Biosorption of heavy metal ions using wheat based biosorbents – A review of the recent literature. *Bioresour. Technol.* 101, 5043–5053.
- Figueira, P., Henriques, B., Teixeira, A., Lopes, C.B., Reis, A.T., Monteiro, R.J.R., Duarte, A.C., Pardal, M.A., Pereira, E., 2016. Comparative study on metal biosorption by two macroalgae in saline waters: single and ternary systems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–13.
- Figueira, P., Lopes, C.B., Daniel-da-Silva, A.L., Pereira, E., Duarte, A.C., Trindade, T., 2011. Removal of mercury (II) by dithiocarbamate surface functionalized magnetite particles: application to synthetic and natural spiked waters. *Water Res.* 45, 5773–84.
- Flouty, R., Estephane, G., 2012. Bioaccumulation and biosorption of copper and lead by a

- unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* in single and binary metal systems: A comparative study. *J. Environ. Manage.* 111, 106–114.
- Fu, F., Wang, Q., 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *J. Environ. Manage.* 92, 407–418.
- Gavrilescu, M., 2004. Removal of Heavy Metals from the Environment by Biosorption. *Eng. Life Sci.* 4, 219–232.
- Hassler, C.S., Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., 2004. Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnol. Oceanogr. Methods* 2, 237–247.
- He, J., Chen, J.P., 2014. A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: Materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools. *Bioresour. Technol.* 160, 67–78.
- Henriques, B., Rocha, L.S., Lopes, C.B., Figueira, P., Monteiro, R.J.R., Duarte, A.C., Pardal, M. A., Pereira, E., 2015. Study on bioaccumulation and biosorption of mercury by living marine macroalgae: prospecting for a new remediation biotechnology applied to saline waters. *Chem. Eng. J.* 281, 759–770.
- Ho, Y.S., Mckay, G., 2004. Sorption of copper (II) from aqueous solution by peat. *Water. Air. Soil Pollut.* 158, 77–97.
- Ho, Y.S., Porter, J.F., McKay, G., 2000. Kinetics of Pollutant Sorption By Biosorbents: Review. *Sep. Purif. Rev.* 29, 189–232.
- Ibrahim, W.M., 2011. Biosorption of heavy metal ions from aqueous solution by red macroalgae. *J. Hazard. Mater.* 192, 1827–1835.
- Jalali, R., Ghafourian, H., Asef, Y., Davarpanah, S.J., Sepehr, S., 2002. Removal and recovery of lead using nonliving biomass of marine algae. *J. Hazard. Mater.* 92, 253–262.
- Kaduková, J., Virčíková, E., 2005. Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. *Environ. Int.* 31, 227–232.
- Kratochvil, D., Volesky, B., 1998. Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends Biotechnol.* 16, 291–300.
- Lamare, M.D., Wing, S.R., 2001. Calorific content of New Zealand marine macrophytes. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 35, 335–341.
- Lopes, C.B., Oliveira, J.R., Rocha, L.S., Tavares, D.S., Silva, C.M., Silva, S.P., Hartog, N.,

- Duarte, A.C., Pereira, E., 2014. Cork stoppers as an effective sorbent for water treatment: the removal of mercury at environmentally relevant concentrations and conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 2108–21.
- Macek, T., Mackova, M., 2011. *Microbial Biosorption of Metals*. Springer Sci. Media 7–18.
- Masakorala, K., Turner, A., Brown, M.T., 2008. Influence of synthetic surfactants on the uptake of Pd, Cd and Pb by the marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Environ. Pollut.* 156, 897–904.
- Mata, Y.N., Blázquez, M.L., Ballester, A., González, F., Muñoz, J. A., 2008. Characterization of the biosorption of cadmium, lead and copper with the brown alga *Fucus vesiculosus*. *J. Hazard. Mater.* 158, 316–323.
- Meenakshi, Maheshwari, R.C., 2006. Fluoride in drinking water and its removal. *J. Hazard. Mater.* 137, 456–463.
- Miller, J.M., Miller, J.C., 2010. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Sixth Edit. ed, Technometrics. Pearson Education Limited.
- Mishra, A., Malik, A., 2012. Simultaneous bioaccumulation of multiple metals from electroplating effluent using *Aspergillus lentulus*. *Water Res.* 46, 4991–4998.
- Mudhoo, A., Garg, V.K., Wang, S., 2012. Removal of heavy metals by biosorption. *Environ. Chem. Lett.* 10, 109–117.
- Nikolaisen, L., Jensen, P.D., Bech, K.S., 2011. *Energy Production from Marine Biomass (Ulva lactuca) Denmark*, Danish Technological Institute 1–72.
- Pan, R., Cao, L., Zhang, R., 2009. Combined effects of Cu, Cd, Pb, and Zn on the growth and uptake of consortium of Cu-resistant *Penicillium* sp. A1 and Cd-resistant *Fusarium* sp. A19. *J. Hazard. Mater.* 171, 761–766.
- Pérez-Llamazares, A., Galbán-Malagón, C.J., Aboal, J.R., Fernández, A. J., Carballeira, A., 2010. Evaluation of cations and chelating agents as extracellular extractants for Cu, Pb, V and Zn in the sequential elution technique applied to the terrestrial moss *Pseudoscleropodium purum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 507–514.
- Predescu, A., Nicolae, A., 2012. Adsorption of Zn , Cu and Cd from wastewaters by means of maghemite nanoparticles. *U.P.B Sci Bull Ser.* 74, 255–264.
- Reddad, Z., Gerente, C., Andres, Y., Le Cloirec, P., 2002. Adsorption of several metal ions onto a low-cost biosorbent: kinetic and equilibrium studies. *Environ. Sci. Technol.* 36,

2067–73.

- Rocha, L.S., Almeida, Â., Nunes, C., Henriques, B., Coimbra, M.A., Lopes, C.B., Silva, C.M., Duarte, A.C., Pereira, E., 2016. Simple and effective chitosan based films for the removal of Hg from waters: Equilibrium, kinetic and ionic competition. *Chem. Eng. J.* 300, 217–229.
- Rocha, L.S., Lopes, C.B., Borges, J.A., Duarte, A.C., Pereira, E., 2013. Valuation of Unmodified Rice Husk Waste as an Eco-Friendly Sorbent to Remove Mercury: a Study Using Environmental Realistic Concentrations. *Water, Air, Soil Pollut.* 224, 1599.
- Romera, E., González, F., Ballester, A., Blázquez, M.L., Muñoz, J.A., 2007. Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae. *Bioresour. Technol.* 98, 3344–3353.
- Rothman, N.J., Canuel, E.A., Beck, A.J., 2013. Trace metal cycling in an algal floway system. *Ecol. Eng.* 52, 290–297.
- Rupérez, P., 2002. Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chem.* 79, 23–26.
- Sari, A., Tuzen, M., 2008. Biosorption of Pb(II) and Cd(II) from aqueous solution using green alga (*Ulva lactuca*) biomass. *J. Hazard. Mater.* 152, 302–308.
- Seiler, H.G., Sigel, A., Sigel, H., 1994. *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*. New York, Marcel Dekker.
- Shams, L., Turner, A., Millward, G.E., Brown, M.T., 2014b. Extra- and intra-cellular accumulation of platinum group elements by the marine microalga, *Chlorella stigmatophora*. *Water Res.* 50, 432–440.
- Shukla, A., Zhang, Y.H., Dubey, P., Margrave, J.L., Shukla, S.S., 2002. The role of sawdust in the removal of unwanted materials from water. *J. Hazard. Mater.* 95, 137–152.
- Spagnuolo, V., Giordano, S., Pérez-Llamazares, A., Ares, A., Carballeira, A., Fernández, J.A., Aboal, J.R., 2013. Distinguishing metal bioconcentration from particulate matter in moss tissue: Testing methods of removing particles attached to the moss surface. *Sci. Total Environ.* 463-464, 727–733.
- Srivastava, S., Goyal, P., 2010. *Novel Biomaterials: Decontamination of Toxic Metals from Wastewater*. Springer.
- Terry, P.A., Stone, W., 2002. Biosorption of cadmium and copper contaminated water by

- Scenedesmus abundans*. *Chemosphere* 47, 249–55.
- Tian, H., Yin, X., Zeng, Q., Zhu, L., Chen, J., 2015. Isolation, structure, and surfactant properties of polysaccharides from *Ulva lactuca* L. from South China Sea. *Int. J. Biol. Macromol.* 79, 577–582.
- Topcuoglu, S., Kirbasoglu, C., Balkis, N., 2003. Heavy metal concentrations in marine algae from the Turkish Coast of the Black Sea. *J. Black Sea/Mediterranean Environ.* 10, 21–44.
- Turner, A., Lewis, M.S., Shams, L., Brown, M.T., 2007. Uptake of platinum group elements by the marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Mar. Chem.* 105, 271–280.
- Turner, A., Pollock, H., Brown, M.T., 2009. Accumulation of Cu and Zn from antifouling paint particles by the marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Environ. Pollut.* 157, 2314–2319.
- US EPA, 2007. Mercury total (organic and 7439-97-6 inorganic). Methods 1–17. URL <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-7473>. Consultado em 7 de março de 2016
- Vasconcelos, M.T.S.D., Leal, M.F.C., 2001. Antagonistic interactions of Pb and Cd on Cu uptake, growth inhibition and chelator release in the marine algae *Emiliania huxleyi*. *Mar. Chem.* 75, 123–139.
- Velásquez, L., Dussan, J., 2009. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. *J. Hazard. Mater.* 167, 713–716.
- Vishnoi, N., Dixit, S., Singh, D.P., 2014. Surface binding and intracellular uptake of arsenic in bacteria isolated from arsenic contaminated site. *Ecol. Eng.* 73, 569–578.
- Volesky, B., 2007. Biosorption and me. *Water Res.* 41, 4017–29.
- Walcarius, A., Mercier, L., 2010. Mesoporous organosilica adsorbents: nanoengineered materials for removal of organic and inorganic pollutants. *J. Mater. Chem.* 20, 4478.
- Wan Ngah, W.S., Hanafiah, M. a. K.M., 2008. Removal of heavy metal ions from wastewater by chemically modified plant wastes as adsorbents: A review. *Bioresour. Technol.* 99, 3935–3948.
- Wang, J., Chen, C., 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol. Adv.* 27, 195–226.
- Wang, J., Chen, C., 2006. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnol. Adv.* 24, 427–451.

- Warnken, K.W., Gill, G.A., Griffin, L.L., Santschi, P.H., 2001. Sediment-water exchange of Mn, Fe, Ni and Zn in Galveston Bay, Texas. *Mar. Chem.* 73, 215–231.
- Williams, C.J., Aderhold, D., Edyvean, R.G.J., 1998. Comparison Between Biosorbents for the Removal of Metal Ions From Aqueous Solutions. *Water Res.* 32, 216–224.